

UNIVERSIDAD DE MADRID
FACULTAD DE DERECHO



TESIS DOCTORAL

**Investigación de un criterio que sirva para determinar la ley
competente en las relaciones jurídicas que se ofrezcan
aparentemente influidas por dos o más de las legislaciones
que rigen dentro de la nacionalidad española**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Gonzalo Fernández de Córdoba y Morales

Madrid, 2015

UNIVERSIDAD DE LEON
FACULTAD DE BIOLOGIA
DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA

"INVESTIGACIONES SOBRE UNA NUEVA VIA DEGRADATIVA
DEL PROPIONATO EN Salmonella typhimurium LT2"

Memoria presentada para as-
pirar al grado de Doctor, por
la Licenciada en Biología:

ALMUDENA FERNANDEZ BRIERA

Vº Bº

El Director de la Tesis

Fdo. Prof. Dr. Amado

Garrido Pertierra



León, Enero de 1985

R 39370

No se encaja
con muchas perso
como tú en el mundo
tu apoyo y ánimo me ha
llezado a poder finalizar y
perfeccionar esta tesis y a mí
personalmente. Un beso

Esta tesis ha sido dirigida por
D. AMANDO GARRIDO PERTIERRA, Prof. Titular
de Bioquímica y Biología Molecular de la
Facultad de Veterinaria de la Universidad
Complutense de Madrid, y realizada en el
Dpto. Interfacultativo de Bioquímica de
la Universidad de León y en el Dpto. de
Bioquímica de la Universidad de Leicester
(Inglaterra).

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi gratitud al Dr. Amando Garrido Pertierra, no sólo por la dirección de esta Tesis Doctoral, sino también por el constante entusiasmo que siempre manifestó para que este trabajo pudiera realizarse.

Al Prof. Ruiz Amil, por sus sugerencias y apoyo en todo momento.

Al Dr. R.A. Cooper de la Universidad de Leices-ter por facilitarme la realización parcial del trabajo experimental en el Departamento de Bioquímica de dicha Universidad.

Por último, a todas aquellas personas, que de una u otra manera, me animaron y ayudaron a concluir esta Tesis Doctoral.

A tí

A mis padres

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

Acet.: Acetato.

Acil-CoA: Acilos derivados de Coenzima A.

ADN: Acido desoxiribonucleico.

ADP: Adenosín difosfato.

AMP: Adenosín monofosfato.

ATP: Adenosín trifosfato.

A-T: Adenina-Timina.

Ab_{XYZnm} : Absorbancia medida a "XYZ" nanómetros.

2-AP: 2-Aminopurina.

AUFS: Escala total de unidades de absorbancia.

BNT: Azul de p-nitrotetrazolio.

CoA (CoA-SH): Coenzima A.

DCPIP: 2-6 diclorofenol indofenol.

DH: Deshidrogenasa.

DHF: Dihidrofolato.

DNPH: 2-4 dinitrofenil hidracina.

DTNB: 5-5' ditiobis-2-nitrobenzoato.

EDTA: Etilen diamino tetraacetato.

EMS: Etil metano sulfonato.

ETF: Flavoproteina transferidora.

FAD: Flavín adenín dinucleótido (forma oxidada).

FADH₂: Flavín adenín dinucleótido (forma reducida).

gli.: Glicerol.

glu.: Glucosa.

G-C: Guanina-Citosina.

HPLC: Cromatografía líquida de alta resolución.

lact.: Lactato.

LB: Caldo Luria.

LDH: Lactato deshidrogenasa.

NAD⁺ (NAD): Nicotinamida adenín dinucleótido (forma oxidada).

NAD(P)⁺ (NADP): Nicotinamida adenín dinucleótido fosfato (forma oxidada).

NADH: Nicotinamida adenín dinucleótido (forma reducida).

NADPH: Nicotinamida adenín dinucleótido fosfato (forma reducida).

NB: Caldo nutriente.

NG: Nitrosoguanidina.

OAA: Oxalacetato.

PEP: Fosfoenolpiruvato.

pir.: Piruvato.

PMS: Fenacina metasulfato.

prp.: Propionato.

psi: Unidad de presión (14 psi = 1 atmósfera).

PTS: Sistema fosfotransferasa.

suc.: Succinato.

TCA: Ciclo de los ácidos tricarboxílicos.

THF: Tetrahidrofolato.

TTZ: Trifenil tetrazolio.

U: Unidades internacionales.

Y: Extracto de levadura.

prp⁻: Mutante incapaz de crecer en propionato.

rev. prp⁺: Revertiente que puede crecer en propionato, pro
cedente de un mutante incapaz de hacerlo.

pps⁻: Fosfoenolpiruvato sintetasa deficiente.

INDICE

INDICE

I. <u>INTRODUCCION</u>	1
II. <u>CONSIDERACIONES TEORICAS GENERALES</u>	16
II.1. <u>Metodología aplicada para el estudio de una ruta catabólica</u>	22
II.1.1. Análisis de intermediarios de secuencias metabólicas en el medio de cultivo	22
II.1.2. Empleo de inhibidores metabólicos	25
II.1.3. Catabolismo parcial de sustratos y sus análogos	29
II.1.4. Adaptación simultánea (Inducción Secuencial)	32
II.1.5. Empleo de extractos libres de células ...	37
II.1.6. Utilización de isótopos radioactivos ...	42
II.1.7. Aislamiento y caracterización de mutantes defectivos en la ruta	47
II.2. <u>Objetivos del presente trabajo de investigación</u> .	55
III. <u>MATERIALES Y METODOS</u>	56
III.1 <u>Materiales</u>	57
III.1.1. Reactivos y productos	57
III.1.2. Material biológico	58

III.2. <u>Métodos</u>	59
III.2.1. Medios de cultivo	59
III.2.1.1. Medios líquidos	60
III.2.1.1.1. Medios líquidos <u>míni</u> mos	60
III.2.1.1.1.1. Medio M-63	61
III.2.1.1.1.2. Medio de Reeves y Ajl (1960).	61
III.2.1.1.2. Medios líquidos com- pletos	62
III.2.1.2. Medios sólidos	63
III.2.2. Medios de mutación	63
III.2.3. Agentes mutagénicos	64
III.2.3.1. Etil metano sulfonato (EMS).	64
III.2.3.2. 2-Aminopurina (2-AP)	65
III.2.4. Síntesis química de derivados de CoA ..	65
III.2.4.1. Reacción con anhídridos: <u>sín</u> tesis de acetil-CoA y propio nil-CoA	66
III.2.4.2. Reacción de anhídridos mix- tos: síntesis de acrilil-CoA	66
III.2.4.3. Comprobación de la pureza de los acil-CoA sintetizados ..	67
III.2.4.3.1. Método del nitropru- siato	67
III.2.4.3.2. Método del DTNB	68
III.2.4.3.3. Cromatografía en ca- pa fina	68
III.2.5. Crecimiento celular	69
III.2.5.1. Crecimiento en medio sólido.	69
III.2.5.2. Crecimiento en medio líquido	70
III.2.5.2.1. Recogida de células.	71

III.2.6. Medida del consumo de oxígeno	71
III.2.7. Técnicas mutagénicas	72
III.2.7.1. Selección de mutantes espon- táneos timina (-)	72
III.2.7.2. Aislamiento y selección de mutantes inducidos	74
III.2.7.2.1. Inducción de mutan- tes por EMS	74
III.2.7.2.2. Inducción de mutan- tes por 2-AP	75
III.2.7.2.3. Selección de mutan- tes por tratamiento con penicilina	76
III.2.7.3. Replicación en placa	77
III.2.8. Preparación de extractos celulares	77
III.2.9. Obtención de células permeabilizadas ..	78
III.2.10. Tratamiento de choque osmótico	79
III.2.11. Técnicas enzimáticas	81
III.2.11.1. Activización del propiona- to intracelular	81
III.2.11.1.1. ATP-monocarboxila to fosfotransfera sa (EC 2.7.2.1.).	81
III.2.11.1.2. Acil-CoA-ortofosfa to aciltransferasa	83
III.2.11.2. α -hidroxiglutarato sintasa (EC 4.1.3.9.)	84
III.2.11.3. α -hidroxiglutarato descar- boxilasa	85
III.2.11.4. Semialdehído succínico des_ hidrogenasa (EC 1.2.1.16.)	86
III.2.11.5. Isocitrato liasa (EC 4.1. 3.1.)	88

III.2.11.6. Malato sintasa (EC 4.1.3.2.)	89
III.2.11.7. α -hidroxiglutarato liasa .	91
III.2.11.8. Propionil-CoA deshidrogena <u>sa</u>	92
III.2.11.8.1. Método de Callely y Lloyd (1964) ...	93
III.2.11.8.2. Método de Callely y Lloyd modificado	94
III.2.11.8.3. Ensayo enzimático de NAD ó NADP	94
III.2.11.8.4. Ensayos de determi <u>nación</u> del produc <u>to</u> formado por cro <u>matografía</u> líquido-líquido	95
III.2.11.9. Acrilil-CoA hidratasa (EC 4.2.1.54.)	96
III.2.11.10. L(-) Lactato deshidrogena <u>sa</u> (EC 1.1.1.27.)	97
III.2.11.11. Fosfoenolpiruvato sinteta <u>sa</u> (EC 2.7.9.2.)	98
III.2.11.12. Fosfoenolpiruvato carboxi <u>lasa</u> (EC 4.1.1.31.)	100
III.2.11.13. Determinación de la forma <u>ción</u> de piruvato a partir de propionil-CoA	101
III.2.11.14. Unidades de actividad enzimática	102
III.2.12. Determinación de la proteína	102
III.2.13. Técnicas cromatográficas	103
III.2.13.1. Cromatografía en columna .	103

III.2.13.1.1. Cromatografía de filtración en gel	103
III.2.13.1.2. Cromatografía de intercambio iónico	104
III.2.13.2. Cromatografía líquido-lí- quido (HPLC)	104
III.2.13.2.1. Curvas patrón de CoA y acilos de CoA	105
III.2.13.2.2. Preparación de la muestra del ensayo enzimático para HPLC	106
III.2.13.2.3. Obtención de com- puestos intermedia- rios para su análi- sis por HPLC	107
III.2.14. Experimentos de transferencia episomal	107
IV. <u>RESULTADOS Y DISCUSION</u>	110
IV.1. <u>Propiedades de crecimiento de Salmonella typhimu- rium LT2</u>	111
IV.1.1. Crecimiento en medio sólido	111
IV.1.2. Crecimiento en medio líquido	113
IV.1.2.1. Crecimiento en medios mínimos .	113
IV.1.2.2. Crecimiento sobre medio M-63 su- plementado con distintos caldos nutritivos	118
IV.1.3. Propiedades de crecimiento de <u>S. typhimu- rium LT2</u> en distintas fuentes de carbono: cálculo de los tiempos de generación	119

IV.2. <u>Estudio de la incorporación de CO₂ en el crecimiento sobre propionato</u>	126
IV.2.1. Efecto de la ruta de carboxilación sobre el tiempo de adaptación ("lag") del crecimiento en propionato	127
IV.2.2. Efecto de la ruta de carboxilación en el tiempo de generación (t)	130
IV.3. <u>Efecto de precultivos (acetato, propionato) sobre el crecimiento en propionato</u>	135
IV.4. <u>Oxidación de metabolitos por células crecidas en propionato, acetato y glicerol</u>	140
IV.4.1. Oxidación por células enteras	141
IV.4.2. Oxidación por células permeabilizadas ...	145
IV.5. <u>Aislamiento de mutantes defectivos en propionato y sus revertientes: propiedades de crecimiento</u> ..	148
IV.5.1. Mutantes y revertientes de <u>S. typhimurium</u> LT2	149
IV.5.1.1. Mutantes inducidos por 2-AP ...	149
IV.5.1.2. Mutantes inducidos por EMS	150
IV.5.2. Mutantes de <u>S. typhimurium</u> LT2 <u>tim⁻</u>	152
IV.5.3. Mutantes de <u>S. typhimurium</u> <u>tim⁻prp⁻</u> y sus revertientes	153
IV.6. <u>Determinaciones de actividades enzimáticas</u>	172
IV.6.1. Activación del propionato intracelular ..	173
IV.6.2. Actividades de las enzimas de la ruta del α -hidroxiglutarato a succinato	178
IV.6.2.1. Actividad α -hidroxiglutarato sintasa	178
IV.6.2.2. Actividades α -hidroxiglutarato descarboxilasa y semialdehído succínico deshidrogenasa	180

IV.6.3. Actividad α -hidroxiglutarato liasa	182
IV.6.4. Actividades de las enzimas del ciclo del glioxilato	184
IV.6.4.1. Actividad isocitrato liasa	185
IV.6.4.2. Actividad malato sintasa	189
IV.6.5. Actividad propionil-CoA deshidrogenasa ..	193
IV.6.6. Actividad acrilil-CoA hidratasa	215
IV.6.7. Actividad lactato deshidrogenasa	219
IV.6.8. Actividad fosfoenolpiruvato sintetasa ...	221
IV.6.9. Actividad fosfoenolpiruvato carboxilasa .	225
IV.6.10. Conversión de propionato en piruvato ...	227
IV.7. <u>Transferencia episomal</u>	232
V. <u>CONCLUSIONES</u>	238
VI. <u>BIBLIOGRAFIA</u>	244

I. INTRODUCCION

I. INTRODUCCION

Los organismos vivos utilizan los nutrientes por medio de secuencias específicas de reacciones enzimáticas, con dos fines esenciales: obtener compuestos precursores de sus constituyentes celulares y energía para los procesos de biosíntesis. El primero de estos propósitos lo logran fragmentando los componentes de la dieta para obtener un conjunto limitado de compuestos de bajo peso molecular, los cuales son, a su vez, los iniciadores de las rutas biosintéticas. Parte de estos compuestos, en la mayoría de las células aerobias, se convierten en último término en intermediarios del ciclo de los ácidos tricarboxílicos que pueden ser oxidados totalmente a dióxido de carbono y agua; como consecuencia de estos procesos, la energía química de los nutrientes se acumula en enlaces fosfato ricos en energía (ATP), energía útil para la célula, cumpliéndose así la segunda función principal de las rutas metabólicas. Esta transferencia energética es realizada por medio de la oxidación de unidades de dos átomos de carbono, que, en principio, se condensan con una molécula aceptora, para después, el nuevo compuesto así formado sufrir una serie de oxidaciones sucesivas en que los electrones liberados

en estos procesos son acoplados a los sistemas de la fosforilación oxidativa; los dos átomos de carbono se pierden fácilmente como CO_2 y la molécula aceptora se regenera nuevamente. En todo momento en el ciclo existe un equilibrio entre las cantidades de carbono que se incorporan y las que se liberan, ya que, cuando los intermediarios son utilizados con fines biosintéticos, las reacciones anapleróticas actúan manteniendo los niveles de intermediarios adecuados. El ciclo de los ácidos tricarboxílicos actúa, por lo tanto, como una ruta central, canalizando y regulando el flujo metabólico en diferentes direcciones según las necesidades de la célula.

La capacidad biosintética alcanza su máxima expresión en el mundo bacteriano y aunque algunas especies bacterianas son incapaces de crecer en determinados compuestos, la inmensa mayoría ha evolucionado de tal forma que puede utilizar como fuente de carbono compuestos de bajo peso molecular y a partir de éstos obtener la energía necesaria y los componentes moleculares. Esta capacidad es, sin duda, consecuencia de su adaptabilidad a las condiciones externas. Mientras las células de los organismos superiores disponen de fluidos extracelulares muy elaborados de composición relativamente constante, las bacterias no poseen un medio de tales características y deben adaptar su metabolismo a los diferentes compuestos que pueden

utilizar como nutrientes.

Los sustratos de bajo peso molecular son susceptibles de ser degradados por algunas especies microbianas gracias a que éstas han desarrollado una estrategia metabólica que en algunos casos requiere soslayar en parte el ciclo de los ácidos tricarboxílicos y utilizar otras rutas alternativas como son el ciclo del glioxilato y el ciclo de los ácidos dicarboxílicos.

El propionato, $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-COO}^-$, se origina en los organismos vivos como producto de la ruta oxidativa de los ácidos grasos en número impar de átomos de carbono y en el catabolismo de la valina, metionina e isoleucina. Asimismo, en algunas bacterias de los géneros Propionibacterium, Megasphaera, Veillonella y Clostridium, el propionato es un producto de la fermentación de carbohidratos, que se forma a través de la ruta de los ácidos dicarboxílicos via succinato, o a través de la ruta reductiva directa que implica el lactil-CoA y el acrilil-CoA (Baldwin, 1966).

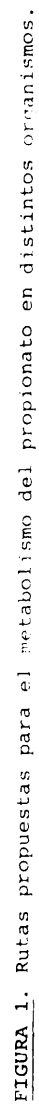
Han sido descritas cinco rutas degradativas para la utilización del propionato por diferentes organismos: la ruta del semialdehído malónico, la del malonil-semialdehído-CoA, la del succinato, la del α -hidroxiglutarato y

la del acrilato (Figura 1). Generalmente, en organismos superiores, el propionato (como propionil-CoA) se convierte en D_S-metil-malonil-CoA, el cual se epimeriza a L_S-metil-malonil-CoA para finalmente isomerizarse e incorporarse al ciclo de los ácidos tricarboxílicos. Sin embargo, no existe tal uniformidad en la transformación del propionato en microorganismos, donde todas las rutas unicamente coinciden en la activación del propionato. En la Tabla I se detallan dichas rutas y las enzimas implicadas en cada una de ellas.

En Escherichia coli se pueden diferenciar tres clases o grupos de cepas según sus comportamientos en la utilización de propionato como fuente de carbono y energía. Un primer grupo que es incapaz de crecer sobre dicho compuesto y del que es preciso aislar mutantes que han adquirido esa capacidad; otro grupo que crece lentamente en propionato y un tercero con crecimiento que se puede considerar normal. En estos últimos grupos se han descrito como más probables las rutas degradativas: del succinato, del acrilato y del α-hidroxiglutarato. Como se puede observar en la Figura 2, mientras la primera ruta es relativamente independiente, las otras dos se encuentran relacionadas por una serie de intermediarios de función anaplerótica o biosintética, lo que hace pensar en un mecanismo de regulación muy complejo. Esta situación parece complicarse aún

más, si cabe, en algunas cepas de E. coli, que utilizan dos rutas degradativas distintas según la fase de crecimiento celular.

A pesar de ser Escherichia coli y Salmonella typhimurium los organismos mejor conocidos a nivel molecular, únicamente han sido descritas unas mil enzimas de las cerca de cuatro mil que pueden ser codificadas por el genoma de estas especies bacterianas.



RUTA METABOLICA (Reacciones)	ENZIMAS	ORGANISMO O TEJIDO	REFERENCIA	OBSERVACIONES
<u>SEMIALDEHIDO MALONICO</u>		<u>Tejido vegetal</u> (cotiledón cacahuet)	Giovanelly y Stumpf (1957 y 1958)	Demuestran la oxidación de propionato a acetato a través de esta vía, con radioisótopos.
Propionato ↓ Propionil-CoA ↓ Acrilil-CoA ↓ β-hidroxi- propionil-CoA ↓ β-hidroxi- propionato	Propionil-CoA deshidrogenasa Acrilil-CoA hidratasa β-hidroxi- propionil-CoA des- sacilasa	<u>Tejido animal</u> (Riñón de cerdo)	Rendina y Coon (1957) Den, Robinson y Coon (1959)	Demostración de las enzimas iniciales de la ruta (hasta beta-hidroxi- propionato). Demostración de la existencia de beta-hidroxi- propionil-CoA DH.
β-hidroxi- propionato ↓ Semialdehido malónico ↓ Acetil-CoA + CO ₂	β-hidroxi- propionil-CoA deshi- drogenasa Semialdehido malónico des- carboxilasa	<u>Alga</u> (Prototheca zopfii)	Callely y Lloyd (1964) Lloyd y Callely (1965) Lloyd (1966)	Demostración de la conversión del propionato en acetil-CoA, vía semialdehido malónico, implicando el ciclo del glioxilato. Confirmación de la acción del TCA y del ciclo del glioxilato en el crecimiento sobre propionato y acetato. No encuentra implicada la acción de la vitamina B ₁₂ en el metabolismo del propionato y propone que la única ruta operativa es la del semialdehido malónico.
<u>MALONIL-SEMIALDEHIDO-CoA</u>		<u>Bacteria</u> <u>Clostridium kluveri</u>	Stadtman y Barker (1950) Stadtman (1955a) Vagelos, Earl y Stadtman (1959a) Vagelos, Earl y Stadtman (1959b) Vagelos y Earl (1959) Vagelos (1960)	Demostración de la transferencia enzimática del grupo fosforilo del acetil-P a ácidos grasos de 3-6 átomos de carbono. Ensayo y purificación de fosfotransacetilasa Proponen esta ruta y describen una acrilil-CoA aminasa, cuyo producto es β-alanil-CoA. Confirman la ruta y no encuentran lactil-CoA DH y sí desacilasa. Identificación del β-hidroxi- propionil-CoA y malonil-semialdehido-CoA como intermediarios Caracterización de la β-hidroxi- propionil-CoA DH y malonil-semialdehido-CoA DH. Formación de acetil-CoA.
Propionato ↓ Propionil-CoA ↓ Acrilil-CoA ↓ β-hidroxi- propionil-CoA ↓ Malonil-semialdehido-CoA ↓ Malonil-CoA ↓ Acetil-CoA + CO ₂	Propionil-CoA deshidrogenasa Acrilil-CoA hidratasa β-hidroxi- propionil-CoA des- hidrogenasa Malonil-semialdehido-CoA deshidrogenasa Malonil-CoA descarboxilasa			

RUTA METABOLICA (Reacciones)	ENZIMAS	ORGANISMO O TEJIDO	REFERENCIA	OBSERVACIONES
<u>CARBOXILACION A SUCCINATO</u>		<u>Tejido animal</u>	Lardy y Peanasky (1953)	Proponen esta ruta en distintos tejidos y - estudian aspectos parciales de ella.
Propionato			Katz y Chaikoff (1955)	
↓			Lardy y Adler (1956)	
Propionil-CoA			Friedberg, Adler y Lardy (1956)	Estudian la reacción de carboxilación.
↓	Propionil-CoA carboxilasa	(Corazon de cerdo)	Flavin, Ortiz y Ochoa (1955)	
Ds-metilmalonil-CoA			Flavin,Castro-Mendoza y Ochoa (1956)	
↓	Metil-malonil-CoA epimerasa		Flavin,Castro-Mendoza y Beck (1956)	Proponen la carboxilación y estudian la isomerización.
Ls-metilmalonil-CoA			Flavin,Castro-Mendoza y Ochoa (1957)	
↓	Metil-malonil-CoA isomerasa		Flavin y Ochoa (1957)	
Succinil-CoA			Beck,Flavin y Ochoa (1957)	Estudian y purifican el sistema de carboxilación dependiente de ATP-prp-CoA carboxilasa.
↓	Succinil-CoA sintetasa		Tiez y Ochoa (1959)	
Succinato			Kaziyo, Ochoa, Warner y Chen (1961)	
			Mazumder, Sasakawa y Ochoa (1963)	Proponen esta ruta como fundamental y estudian la carboxilación.
			Kaziyo y Ochoa (1964)	
			Smith y Monty (1959)	
		(Hígado de rata)	Gurnani, Mistry y Johnson (1960)	Demuestran que la vit. B12 esta implicada en el metabolismo del -- propionato en animales por ser este via carboxilación.
			Lengyel, Mazumder y Ochoa (1960)	
			Halenz y Lane (1960)	
		(Riñón de oveja)		Estudian el papel de la vit. B12 y las propiedades de la metilmalonil-CoA isomerasa.
		(Hígado de ternera)		Estudian la carboxilasa
		(Hígado humano)		Purifican y estudian la propionil-CoA carboxilasa.
			Kalousek, Darigo y Rosenberg (1980)	
			Gravel, Lam, Muhuran y Kronis (1980)	

RUTA METABOLICA (Reacciones)	ENZIMAS	ORGANISMO O TEJIDO	REFERENCIA	OBSERVACIONES
Continuación <u>CARBOXILACION A SUCCINATO</u>		<u>Protozoo</u> <u>Ochromonas malhamensis</u>	Marchesi y Latja (1961)	Observan la importancia de la vit. B ₁₂ .
			Arnstein y White (1962)	Encuentran que en ausencia de vit. B ₁₂ se bloquea la oxidación de propionato.
		<u>Bacteria</u> <u>Chlorobium thiosulphatophilum</u>	Larsen (1951)	Describe por primera vez la ruta de carboxilación.
		<u>Rhizobium meliloti</u> <u>Rhizobium japonicum</u>	De Hertogh, Mayeux y Evans (1964a)	Encuentran que el metabolismo del propionato esta fuertemente condicionado por la concentración de Co.
			De Hertogh, Mayeux y Evans (1964b)	Demuestran la existencia de las enzimas de esta ruta.
		<u>Micrococcus denitrificans</u>	Smith y Kornberg (1967)	Describen la presencia de las enzimas de la ruta. No hallan isocitrato liasa e infieren que no opera la ruta del alfa-hidroxiglutarato.
		<u>Rhodospirillum rubrum</u>	Elsden y Ormerod (1956)	Sugieren que la ruta seguida implica succinato.
			Clayton, Dettmer y Robertson (1957)	Comprobación del papel fundamental del CO ₂ en la ruta.
			Gibson y Knight (1961)	Demuestran la existencia de las enzimas implicadas en la carboxilación.
		<u>Rhodopseudomonas capsulata</u>	Knigh (1962)	Utilizando radiosotopos y técnicas enzimáticas confirman la operatividad de la ruta en esta bacteria fotosintética y en <u>Rhodospirillum rubrum</u> .
			Olsen y Merrik (1968)	Purificación de propionil-CoA carboxilasa.
		<u>Mycobacterium smegmatis</u>	Stjernholm, Noble y Kochwaser (1962)	Estudios de la carboxilación del propionil CoA a metilmalonil-CoA.
			Stjernholm, Noble y Kochwaser (1967)	Confirmación de la operatividad de esta ruta.
			Henrikson y Allen (1979)	Purificación de la enzima cabecera de ruta.
			Haase, Henrikson, Treble y Allen (1982)	Estudios estructurales y funcionales de la prp-CoA carboxilasa.
		<u>Flavobacterium</u>	Ayers (1962a y b)	Efecto de la deficiencia en vi. B ₁₂ .

RUTA METABOLICA (Reacciones)	ENZIMAS	ORGANISMO O TEJIDO	REFERENCIA	OBSERVACIONES
Continuación <u>CARBOXILACION A SUCCINATO</u>		<u>Propionibacterium shermanii</u> (formación propionato)	Phares, Delwiche y Carson (1956) Stadtman, Overath, Eggerer y Lynen (1960) Stjernholm y Wood (1961) Wood y Stjernholm (1961) Kellermeyer y Wood (1968) Wood, Jacobson, Gerwin y Northrop (1968) Wood y Utter (1966)	Demostración de la incorporación de ^{14}C propionato en succinato. Observan la efectividad de la biotina y de la vit. B ₁₂ en el metabolismo del propionato, por ser esenciales en la ruta de carboxilación. Purificación y caracterización de una transcarboxilasa. Purificación de la isomerasa, la cual precisa vit. B ₁₂ para su actividad. Ensayo y purificación de la oxalacetato transcarboxilasa. Analizan el papel del CO ₂ en el metabolismo del propionato.
		<u>Micrococcus lactilycus</u> (formación propionato)	Foubert y Douglas (1948)	Describen la formación de propionato a partir de succinato.
		<u>Escherichia coli</u> E-26 (proceso de adaptación)	Kolodziej, Wegener y Ajl (1968) Wegener, Reeves y Ajl (1968a)	Encuentran que un mutante deficiente en las enzimas de carboxilación es incapaz de iniciar el crecimiento. Proponen la ruta de carboxilación como operativa, en la adaptación, ya que el HCO ₃ y la vit. B ₁₂ reducen el tiempo de adaptación.
<u>ALFA-HIDROXIGLUTARATO A SUCCINATO</u> Propionato ↓ Propionil-CoA + glioxilato ↓ α-hidroxiglutarato sintasa ↓ α-hidroxiglutarato ↓ α-hidroxiglutarato descarboxilasa ↓ Semialdehído succínico ↓ Semialdehído succínico deshidrogenasa ↓ Succinato		<u>Bacteria Escherichia coli</u> E-26	Reeves y Ajl (1962) Reeves, Stahl y Ajl (1963) Rabin, Reeves, Wegener Megraw y Ajl (1965) Reeves, Urbano y Ajl (1965) Wegener, Furmanski y Ajl (1967)	Descripción de la beta condensación enzimática del propionil-CoA y el glioxalato. Demostración de la formación de alfa-hidroxiglutarato. Proponen que el alfa-hidroxiglutarato formado puede metabolizarse por esta vía. Demostración de la formación de semialdehído succínico, y succinato a partir de este con utilización de NADP. Estudian las enzimas condensantes del glioxilato.

RUTA METABOLICA (Reacciones)	ENZIMAS	ORGANISMO O TEJIDO	REFERENCIA	OBSERVACIONES
Continuación <u>ALFA-HIDROXIGLUTARATO</u> <u>A SUCCINATO</u>				
		<u>Escherichia coli E-26</u> (adaptación)	Wegener, Reeves y Ajl (1967a) Wegener, Reeves y Ajl (1968a) Wegener, Reeves y Ajl (1968b)	Aunque proponen la ruta via lactato, sugieren que esta también podría operar. Indican que esta ruta podría ser funcional para formar intermediarios C ₄ . Proponen esta ruta para formar intermediarios C ₄ en un mutante valerato ⁻ .
		<u>Escherichia coli K12</u>	Kay (1972)	Usando mutantes de las cepas K _I y K _{II} que crecen en propionato, indica que esta ruta opera alternativa con la del acrilato, implicando el ciclo del glioxilato.
		<u>Escherichia coli</u>	Spratt, Ginsburgh y Nunn (1981)	Utilizando un mutante que mapea en el minuto 98, no concluyen si es esta ruta o via acrilato.
<u>ALFA-HIDROXIGLUTARATO</u> <u>A LACTATO + ACETATO</u>		<u>Hongos</u> <u>Aspergillus glaucus</u> <u>Penicillium</u> <u>Bacteria</u> <u>Pseudomonas aeruginosa</u> <u>P. fluorescens</u>	Richards y Lloyd (1966)	Demuestran la existencia de alfa-hidroxi-glutarato sintasa y liasa así como la de las enzimas del ciclo del glioxilato.
Propionato ↓ Propionil-CoA + Glioxalato ↓ α-hidroxi-glutarato sintasa α-hidroxi-glutarato ↓ α-hidroxi-glutarato isomerasa Citramalato ↓ α-hidroxi-glutarato liasa Lactato + Acetato ↓ lactil-CoA sintetasa Lactil-CoA ↓ lactil-CoA deshidrogenasa Piruvil-CoA ↓ Aldehído hidroxipirúvico ↓ ↓ ↓ 1-3 difosfoglicerato		<u>Escherichia coli E-26</u>	Reeves y Ajl (1962) Reeves, Stahl y Ajl (1963) Reeves y Ajl (1963) Megraw, Reeves y Ajl (1965 a y b)	Descripción de la α-hidroxi-glutarato sintasa. Demostración de la formación de alfa-hidroxi-glutarato. Propugnan la formación de lactato y acetato a partir de alfa-hidroxi-glutarato. Describen una lactil-CoA sintetasa y una lactil-CoA deshidrogenasa con formación de piruvil-CoA, todo ello a partir del lactato formado por la alfa-hidroxi-glutarato liasa.

RUTA METABOLICA (Reacciones)	ENZIMAS	ORGANISMO O TEJIDO	REFERENCIA	OBSERVACIONES
Continuación <u>ALFA-HIDROXIGLUTARATO</u> <u>A LACTATO + ACETATO</u>			Reeves y Ajl (1965a) Reeves y Ajl (1965b) Rabin, Reeves, Wegener, Megraw y Ajl (1965)	Formación de citramalato a partir de glicoxalato, posiblemente por isomerización del alfa-hidroxiglutarato. Descripción de la formación de aldehído hidroxipirúvico a partir de lactil-CoA y su posterior metabolismo a l-3 difosfoglicerato. Confirmación de la operatividad de la ruta completa.
<u>α-OXIDACION A LACTATO</u> Propionato ↓ Propionil-CoA ↓ Propionil-CoA deshidrogenasa Acrilil-CoA ↓ Acrilil-CoA hidratasa Lactil-CoA ↓ Lactil-CoA desacilasa Lactato ↓ Lactato deshidrogenasa Piruvato ↓ Piruvato deshidrogenasa Acetil-CoA ↓ Fosfoenolpiruvato sintetasa Fosfoenolpiruvato		<u>Tejido animal</u> (Hígado de conejo) (Corazón de paloma) <u>Bacteria</u> <u>Clostridium propionicum</u> (formación y oxidación) <u>Pseudomonas aeruginosa</u>	Mahler y Huennekens (1953) Vagelos, Earl y Stadtman (1959b) Cardon y Barker (1947) Leaver, Wood y Stjernholm (1955) Stadtman (1955a y b, 1956) Stadtman y Vagelos (1958) Vagelos, Earl y Stadtman (1959b) Goldfine y Stadtman (1960) Sokatch (1966 y 1967)	Sugieren esta ruta, pero sin implicar intermediarios activados. Demuestran la existencia de una lactil-CoA hidrasa, pero no encuentran lactil-CoA DH ni desacilasa. Usando suspensiones celulares proponen esta ruta, identificando aciles de lactato y acrilato. Identifican las enzimas de la ruta en la fermentación del propionato. Ensayo de la fosfo-transacetilasa, formación de acrilil-CoA y de beta-alanil-CoA a partir de este. Confirman la operatividad de la ruta. No encuentran lactil-CoA DH y si desacilasa. Formación de propionato a partir de beta-alanina por desaminación. Proponen que el propionato se convierte en C ₃ via alfaoxidación y en C ₄ via carboxilación.

RUTA METBOLICA (Reacciones)	ENZIMAS	ORGANISMO O TEJIDO	REFERENCIA	OBSERVACIONES
Continuación <u>α-OXIDACION A LACTATO</u>		<u>Megasphaera elsdenii</u> (formación y oxidación)	Cardon y Barker (1947)	Usando suspensiones celulares demuestran la ruta.
			Leaver, Wood y Stjernholm (1955)	Con radioisotopos proponen esta ruta.
			Ladd (1959)	Describe por primera vez la lactil-CoA deshidratasa.
			Ladd y Walker (1959)	Estudian las transformaciones de lactato y acrilato para dar propionil-CoA.
			Baldwin, Woody Emery (1961)	Transformación de lactato en propionato a través de aciles-CoA
			Baldwin, Woody Emery (1965)	Confirman la ruta y purifican la lactil-CoA deshidratasa.
			Baldwin y Wood (1966)	Proponen un ensayo para la lactil-CoA deshidratasa y la caracterizan.
		<u>Moraxella lwoffii</u>	Hodgson y McGarry (1968a y b)	Determinan la presencia de las enzimas de la ruta e implican el ciclo del glioxilato.
		<u>Escherichia coli</u> E-26	Wegener, Reeves y Ajl (1967a y b)	Demostración por radiorespirometría y espectrofotometría de las enzimas de la ruta.
			Wegener, Reeves, Rubin y Ajl (1968b)	Sugieren esta ruta en determinadas fases de crecimiento.
			Wegener, Vanderwinkel Reeves y Ajl (1969)	Proponen esta ruta con formación de PEP en las primeras fases y acet-CoA en las últimas.
		<u>Escherichia coli</u> K12	Wegener, Vanderwinkel Reeves y Ajl (1969)	Idem <u>E. coli</u> E-26.
			Overath, Pauli y Schairer (1969)	Proponen que las enzimas de oxidación del propionato son similares a las de la beta-oxidación de ácidos grasos.
			Weeks, Shapiro, Burns y Wakil (1969)	
			Kay (1972)	Sugiere esta ruta junto con la del alfa-hidroxi-glutarato a succinato.
		<u>Escherichia coli</u> W	Wegener, Vanderwinkel Reeves y Ajl (1969)	Describen la operatividad de esta ruta, sin implicar el ciclo del glioxilato.
		<u>Escherichia coli</u>	Spratt, Ginsburg y Nunn (1981)	Utilizando un mutante que mapea en el minuto 98 no concluyen si es esta ruta o la del alfa-hidroxi-glutarato.

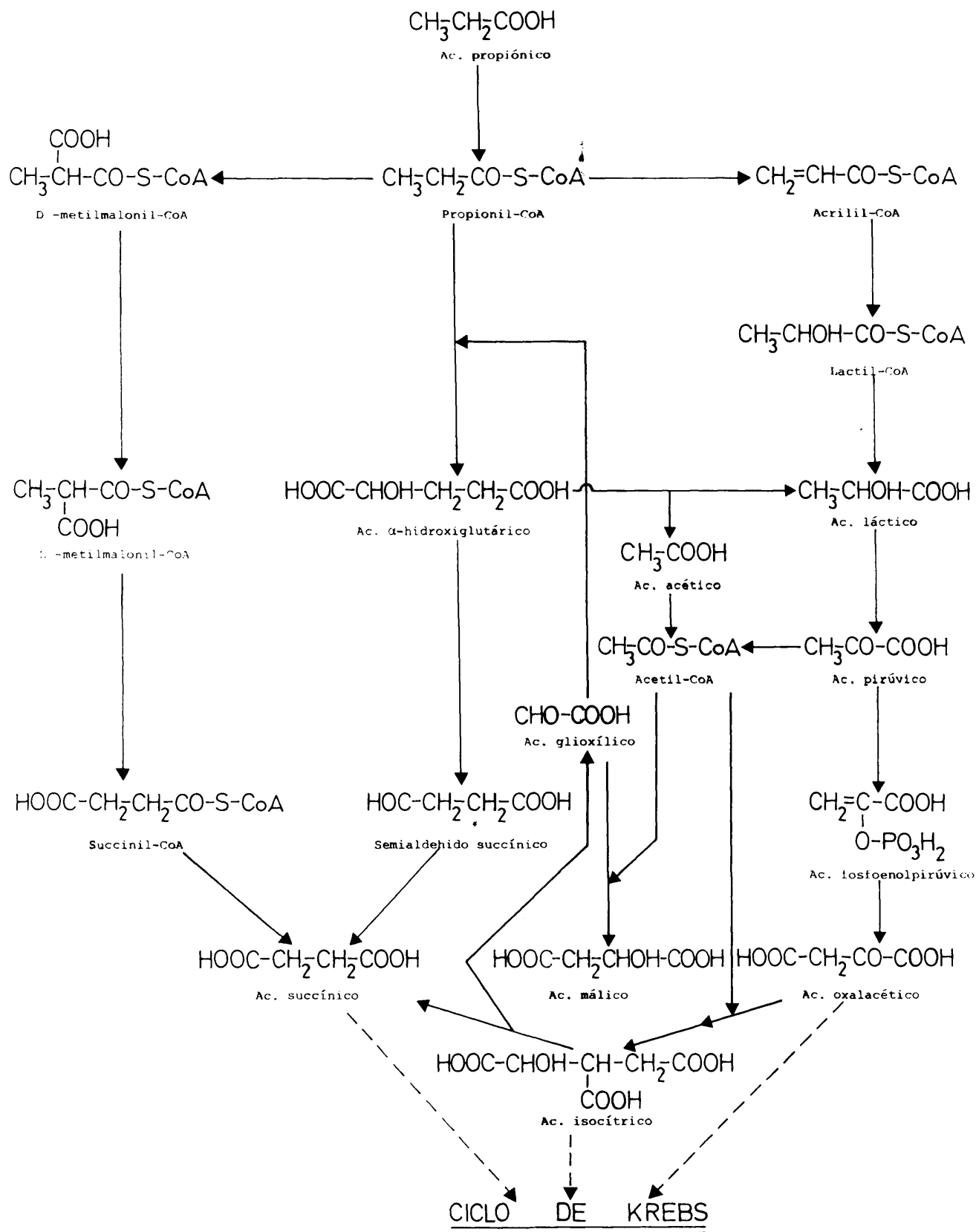


FIGURA 2. Rutas descritas para el metabolismo del propionato en *Escherichia coli*.

II. CONSIDERACIONES TEORICAS GENERALES

II. CONSIDERACIONES TEORICAS GENERALES

Para evaluar los métodos de investigación del metabolismo bacteriano o de otras formas de vida debemos preguntarnos qué hechos sobresalientes distinguen la química de la materia viva de la de otros sistemas químicos.

En primer lugar, cuando empieza la vida, el carbono se encontraba en forma de metano o compuestos altamente reducidos debido al abundante hidrógeno entonces existente en la tierra primitiva; ahora la mayoría del carbono se encuentra en formas como CO_2 y carbonatos, principalmente.

Para mantener la vida se necesita que el carbono esté reducido por el hidrógeno hasta el nivel que requieren los constituyentes celulares. Este proceso altamente endergónico es realizado por los organismos fotosintéticos.

El segundo contraste aparece cuando consideramos los cambios de entropía siempre crecientes en la materia

inanimada y decrecientes en los procesos biosintéticos de la materia viva. Sin embargo, esto no constituye ningún misterio termodinámico, ya que, la disminución de entropía que ocurre en la materia viva, es compensada por la energía libre obtenida al degradar los sustratos de crecimiento (y por el aumento de entropía que suele darse a los procesos catabólicos), siendo su fuente primaria la energía solar captada en la fotosíntesis.

En las secuencias biosintéticas los átomos de hidrógeno son transferidos, usualmente, al carbono desde el NADPH, siendo el NAD^+ uno de los aceptores de los mismos en los procesos de degradación. La energía liberada en estas degradaciones es generalmente acumulada en la molécula de ATP, que se va a utilizar en los procesos biosintéticos. Este recurso metabólico pudo apoyarse en el uso de fosfatos inorgánicos como fuentes de energía por las primeras formas de vida, ya que, tanto el NADPH como el ATP, tienen dos propiedades esenciales para su función: son compuestos con alto contenido energético real y potencial, y además son estables en soluciones neutras durante largos periodos de tiempo.

Las rutas biosintéticas necesitan energía, poder reductor y materia prima, y están abastecidas por los procesos degradativos, existiendo una interrelación entre las

diferentes rutas metabólicas. Así un paso metabólico implicará un cierto número de reacciones interconectadas, pudiéndose afirmar que pocas reacciones funcionan aisladas. Por ello, para investigar una determinada reacción será necesario aislarla, identificando cada enzima posiblemente relacionada con ella, así como estudiar la conexión de cada ruta relacionada con el resto en el metabolismo de la célula entera.

Otros dos hechos destacables en la química de la materia viva son la extrema rapidez con que transcurren las reacciones metabólicas netas y el modo por el que se lleva a cabo la regulación de sus velocidades. Todo ello se debe a la presencia de enzimas, las cuales deben su especificidad y efectividad de acción al hecho de ser macromoléculas proteicas con conformaciones definidas y con centros específicos catalíticos y, en algunos casos, de regulación, susceptibles además de ser inducida o reprimida su biosíntesis, para una mejor regulación de las rutas metabólicas.

La completa elucidación de las reacciones químicas y de las enzimas participantes en una ruta metabólica muestran un modelo que incide repetidamente en distintas áreas de la investigación bioquímica. En general, los métodos de estudio de rutas metabólicas en organismos superio-

res, pueden ser semejantes o diferir de los que se aplican a los microorganismos. Con ambos tipos de organismos se puede obtener información acerca de la operatividad de una ruta metabólica, si se relacionan los compuestos excretados con los utilizados.

Los experimentos de resolución de una ruta se abordan fácilmente con microorganismos, ya que éstos pueden crecer en medios de sales minerales suplementados separadamente con distintas fuentes de carbono y energía, y los productos de la degradación, en cada caso, pueden ser aislados de los fluidos de cultivo.

Por otra parte, células enteras de bacterias son utilizadas más convenientemente que animales intactos: su capacidad para oxidar sustratos en un respirómetro puede proporcionar información importante.

Los procedimientos para romper células microbianas han proporcionado la oportunidad de estudiar las enzimas contenidas en su interior y debido a que su organización es, generalmente, menos compleja que en organismos superiores, la mayoría de las enzimas de interés se pueden obtener en formas solubles mediante ruptura celular o unidas a la membrana plasmática. Sin embargo, en algunos casos, la extracción no es un proceso completamente decisivo

dado que la determinación de una actividad enzimática concreta en un extracto crudo no refleja su importancia en la célula intacta. Ahora bien, cuando se demuestra que las reacciones de las enzimas aisladas forman parte de una secuencia en el interior de la célula, ésto si es muy posible que proporcione información valiosa. Asimismo nos servirá de gran ayuda el poder aislar organismos mutantes defectivos en determinadas enzimas de la secuencia de reacciones; las consecuencias metabólicas de tales deficiencias, proporcionarían una prueba directa para la comprobación o desestimación de la ruta propuesta; este tipo de estudio es más factible en bacterias.

La investigación bacteriana ofrece la ventaja de permitir un mantenimiento y un crecimiento relativamente económico de las células, así como su fácil almacenamiento y conservación, juntamente con la posibilidad de disponer, en corto espacio de tiempo, de cantidad suficiente de material biológico para las investigaciones. Todo ello hace de las bacterias uno de los materiales más idóneos en experimentación bioquímica.

Pero el conocimiento adquirido en el estudio de las rutas metabólicas en bacterias tendría poca validez, si las rutas fueran distintas de aquellas que tienen lugar en organismos superiores. Sin embargo, a pesar de las difere

rencias encontradas en la capacidad para sintetizar o degradar un metabolito particular, la mayoría de las formas de vida utilizan secuencias bioquímicas semejantes para obtención de energía o para la biosíntesis, lo que subraya la teoría de la unidad bioquímica, reflejando la existencia de formas ancestrales comunes.

II. 1. Metodología aplicada para el estudio de una ruta catabólica

II. 1.1. Análisis de intermediarios de secuencias metabólicas en el medio de cultivo

Durante varios años los únicos métodos empleados para estudiar el metabolismo microbiano fueron aquellos que se basaban en el análisis de compuestos acumulados en el medio de cultivo. Muchos de los resultados así obtenidos proporcionaron valiosa información para dilucidar la ruta de fermentación alcohólica de la glucosa por levaduras. Sin embargo, la creencia general de que el procedimiento podía ser aplicado con éxito al conocimiento de otras rutas catabólicas, rápidamente tuvo que ser abandonada por las limitaciones generales que presentaron estos experimentos. Se observó, en muchos casos, de forma evidente, que el compuesto que se acumulaba en el medio de crecimiento no era necesariamente un intermediario de la ruta

metabólica que transcurre desde la fuente de carbono a las sencillas moléculas formadas por degradación. En condiciones anaeróbicas, un organismo puede obtener energía transfiriendo los átomos de hidrógeno desde sus sustratos de crecimiento a otros metabolitos y este proceso produce una gran variedad de productos de fermentación. Así, cuando Clostridium kluyveri crece en etanol y acetato como fuentes de carbono, el hidrógeno es transferido a intermediarios de la ruta biosintética para originar los ácidos butírico y hexanoico, los cuales, consecuentemente, se acumulan como productos de fermentación. Sin embargo, la mayoría de las bacterias aerobias utilizan el TCA como centro de su metabolismo y los átomos de hidrógeno son transferidos, por medio de coenzimas, al oxígeno a través de la cadena del transporte electrónico presente en estos microorganismos. Por consiguiente, cuando el suplemento de oxígeno no es el factor limitante del crecimiento, los compuestos detectados en el medio de cultivo proceden de la oxidación de la fuente de carbono y su acumulación es transitoria, ya que alcanzan un máximo para luego decrecer tan rápidamente, como se consume la fuente de carbono primaria.

En consecuencia, el primer paso en el conocimiento de una ruta metabólica en bacterias aerobias ha consistido en el aislamiento de compuestos de los medios de cultivo. Un método que proporciona cantidades adecuadas de

estos compuestos es la Técnica de Kluver y van Zijp, desarrollada en 1951, y en la que los organismos se mantienen, en medio líquido, en fase estacionaria de crecimiento. Esta técnica fue utilizada por Kilby (1951) en el aislamiento del ácido beta-oxoadípico de cultivos que utilizaban como fuente de carbono, fenol ó ácido benzoico, iniciando la investigación sobre el metabolismo de compuestos aromáticos por bacterias. Ahora bien, el hecho de que un metabolito sea excretado por las células tiene un valor limitado como compuesto implicado en una ruta degradativa.

Uno de los ejemplos más claros en este aspecto, es la presencia de los ácidos 2- y 5-oxoglucónicos y el ácido glucónico en el medio de cultivo de células de Acetomonas suboxydans crecidas sobre glucosa. Este microorganismo produce cantidades elevadas de ácido 5-oxoglucónico que cristaliza en el medio de cultivo como sal cálcica. DeLey y Stouthamer (1959), demostraron que los ácidos glucónico y oxoglucónico se sintetizan por una ruta lateral. Cuando se produce suficiente NADPH, deshidrogenasas específicas y reversibles, las cuales fueron aisladas por estos autores, reducen los oxoácidos; el gluconato resultante, después de la fosforilación, es oxidado a través del ciclo de los fosfatos de pentosa. Este ciclo, y no una ruta de oxidación, es el principal proceso oxidativo en Acetobacter.

El hecho de que un metabolito aumente su concentración hasta un valor determinado y después se reduzca, ha servido a Dagley y col. (1965) a estudiar la cinética de acumulación de un compuesto aislado del medio de cultivo. Estos autores observaron en especies de Moraxella crecidas en ácido fenilacético, que se acumulaba alfa-oxoglutarato en el medio, sugiriendo que dicho compuesto se formaba directamente del sustrato de crecimiento antes de entrar en el TCA. Posteriores investigaciones demostraron que otros compuestos procedentes del catabolismo del ácido fenilacético, eran el acetil-CoA y el fumarato. Por otra parte, cuando las mismas especies de Moraxella crecían en acetato como fuente de carbono, el alfa-oxoglutarato se acumulaba nuevamente, y, en este caso, el sustrato de crecimiento no sufría degradación previamente. Estas observaciones pueden simplemente reflejar las proporciones de varias enzimas del ciclo, y las reacciones relacionadas, las cuales eran sintetizadas en respuesta a las necesidades metabólicas de los cultivos en crecimiento. Un metabolito podría, por lo tanto, ser fácilmente identificable y otro escapar a la detección, aunque ambos pertenezcan a la misma ruta metabólica.

II. 1.2. Empleo de inhibidores metabólicos

Como anteriormente hemos indicado, un intermedia

rio químico de una secuencia puede acumularse en el medio de cultivo, y durante un cierto tiempo mantener su concentración constante, porque la velocidad de síntesis y degradación se igualan y, posteriormente, disminuir su concentración con el tiempo, hasta alcanzar valores próximos a cero. Tanto la concentración del metabolito, como el tiempo de permanencia en el medio de cultivo, se pueden aumentar añadiendo, al medio de cultivo, sustancias inhibidoras. Estos compuestos se suelen emplear en el estudio de los mecanismos de acción de las enzimas, pero ocasionalmente se han utilizado también en el estudio de las rutas metabólicas. Es bien conocido, en este sentido, la utilización del iodoacetato y fluoruro de sodio, para inhibir la acción de la triosafofato isomerasa y enolasa, en el estudio de la ruta glucolítica.

La utilización de inhibidores, como sulfanilamida y azaserina, ha sido realizada con éxito, en el estudio de la ruta biosintética de nucleótidos de purina y la utilización de antibióticos como penicilina, bacitrina, novobiocina y oxamicina en el conocimiento de la naturaleza de las paredes bacterianas.

La utilización del arsenito sódico merece un comentario más extenso. Así, se pudo comprobar que, en presencia de arsenito, las células de Pseudomonas, crecidas

en L-arabinosa, acumulaban alfa-oxoglutarato. Posteriormente, se descubrió que, en estos microorganismos, transformaban la pentosa en alfa-oxoglutarato, por una ruta que incluye L-arabonato, L-3-desoxi-2-oxoarabonato y alfa-oxoglutarato semialdehído (Stoolmiller y Abeless, 1966). Smith y Kornberg (1967), encontraron que las suspensiones de células de Micrococcus denitrificans, inhibidas parcialmente por arsenito, oxidaban el L-malato y el propionato, acumulándose piruvato en un 80%. Cuando a la suspensión se agregó bicarbonato sódico, marcado radioactivamente con ^{14}C , el piruvato formado a partir del propionato se encontraba fuertemente marcado, mientras el formado a partir del L-malato no lo estaba. Esta observación sugirió que la utilización de propionato por estos microorganismos, implicaba una previa carboxilación a succinato, el cual origina piruvato via malato, malato y oxalacetato. Callely y Lloyd en Prototheca zopfii (1964) usando esta técnica detectaron la formación a partir de propionato de alfa-oxoglutarato y de semialdehído malónico. Asimismo, Hodgson y McGarry (1968a) en Moraxella lwoffii, crecida en presencia de arsenito sódico, determinaron que existía una conversión cuantitativa 1:1 de propionato a piruvato en las primeras fases de crecimiento, pero cuando el propionato era completamente utilizado desaparecía el piruvato y se acumulaba 2-oxoglutarato. Usando técnicas adicionales, los autores mencionado llegaron a proponer para la degradación del pro

pionato la ruta oxidativa directa en Moraxella y la ruta via semialdehído malónico en Prototheca.

El arsenito parece inhibir la descarboxilación oxidativa de los alfa-oxácidos porque se combina con los dos átomos de azufre del ácido lipoico, uno de los cofactores del sistema enzimático, para formar un arsenito cíclico. En principio, muchos compuestos pueden utilizarse, inhibidores si se combinan con grupos protéticos o coenzimas, bloqueando así el metabolismo, pero su uso se restringe, cuando dichos compuestos interaccionan con un amplio espectro de reacciones. Un elevado número de enzimas muestran requerimientos absolutos por iones metálicos y, en consecuencia, pueden ser inactivados por agentes quelantes, tales como el etilendiaminotetraacetato (EDTA). Sin embargo, un agente quelante puede ser útil si es específico para un ión metálico determinado y si la reacción bloqueada se encuentra próxima al comienzo de la ruta degradativa.

Debe de tenerse en cuenta que es muy difícil encontrar un inhibidor tan específico en su modo de acción que actúe únicamente sobre una enzima sin afectar al resto de una ruta metabólica. Aún así han sido descritos como ejemplos clásicos: el bisulfito sódico que se combina con el acetaldehído, las hidroxilaminas que interaccionan con

los acil-CoA e impiden su metabolismo posterior, la semicarbacida, que no solamente se une a los alfa-oxoácidos, sino también al fosfato de piridoxal e inhibe las enzimas que requieren este cofactor, el ácido acrílico, que inhibe la beta-oxidación porque se combina con la acil-CoA sintetasa y la 3-cetoacil-CoA tiolasa (Thijsse, 1964).

Actualmente, el empleo de inhibidores en la determinación de una ruta metabólica está limitado a experimentos preliminares, ya que generalmente no se conoce con exactitud el punto de acción de un inhibidor y los investigadores prefieren el aislamiento de mutantes auxotróficos u otras técnicas, cuya utilización no encierre ninguna clase de incertidumbre.

II. 1.3. Catabolismo parcial de sustratos y sus análogos

Se puede utilizar las diferentes especificidades que presentan las enzimas por compuestos análogos al sustrato para obtener información acerca de una ruta degradativa. Es decir, si las primeras enzimas de una ruta pueden catalizar la oxidación de un análogo del sustrato y el metabolito resultante no puede ser transformado por la enzima siguiente, aquel podría acumularse en el medio. En estas condiciones, puede aislarse el metabolito, identificarse y determinarse su posición en la ruta metabólica. Por

ejemplo, algunas especies de Pseudomonas oxidan el p-cresol a p-hidroxibenzoato; pero esta transformación fue difícil de establecer porque el p-hidroxibenzoato es rápidamente hidroxilado para dar homoprotocatecato. Sin embargo, cuando se incorporó un segundo grupo metilo a la molécula de p-cresol, rápidamente se acumulaba en el medio de cultivo un sustituyente metilado del ácido p-hidroxibenzoico (Dagley y Patel, 1957). Este método también ha sido utilizado con extractos crudos. Tales extractos de Pseudomonas, cuando crecen en ácido benzoico, contienen una dioxigenasa que actúa sobre el catecol, que dificulta la demostración de la presencia de este compuesto en la ruta degradativa. Sin embargo, Ichihara y col. (1962), demostraron que el benzoato y el m-clorobenzoato eran transformados por los extractos, pero no así el 3-clorocatecol, que se acumulaba en la mezcla de reacción.

Cuando se utilizan células intactas, las enzimas de una ruta degradativa secundaria pueden desreprimirse tan rápidamente como un metabolito derivado de la ruta principal se acumula. Es decir, en este caso, no solamente el metabolito cesa de acumularse en el medio sino que su concentración tiende a reducirse al catabolizarse por la ruta secundaria. Estos hechos pueden prevenirse si se utilizan suspensiones celulares no proliferantes y se añade cloranfenicol para impedir la síntesis de nuevas enzimas.

Algunas especies de Moraxella degradan los ácidos dicarboxílicos por un proceso de beta-oxidación. Aquellos ácidos que tienen un número par de átomos de carbono mayor de cuatro originan intermediarios del TCA, succinato y acetato, mientras aquellos que tienen un número impar de átomos de carbono mayor de cinco, producen acetato y glutarato. Este último compuesto es degradado por un conjunto de enzimas diferentes de la beta-oxidación y que únicamente se encuentran presentes en células crecidas en ácidos con un número impar de átomos de carbono. Esto fue demostrado directamente incubando células, las cuales habían sido crecidas previamente en ácido adípico, en ácido pimélico y en presencia de cloranfenicol, e identificando el ácido acumulado como ácido glutárico. Sin embargo, en ausencia de cloranfenicol, el glutarato no se acumulaba y el ácido pimélico era oxidado completamente (Chapman y Duggleby, 1967). En algunas ocasiones, en vez de usar cloranfenicol da buenos resultados someter las células a la acción de luz ultravioleta para impedir la síntesis de nuevas enzimas. Así, Palleroni y Stanier (1964), incubaron Pseudomonas fluorescens con L-triptófano por un periodo de tiempo suficiente para inducir únicamente las enzimas que transforman el aminoácido en antranilato. Para ello la suspensión celular fue irradiada con luz ultravioleta para impedir la síntesis de proteínas, e incubada nuevamente con mayor cantidad de L-triptófano. El sustrato se convirtió casi cuantitati-

vamente en antranilato por las células irradiadas, mientras sin este tratamiento el L-triptófano y el antranilato son catabolizados a metabolitos del TCA.

II. 1.4. Adaptación simultánea (Inducción secuencial)

Cuando un compuesto ha sido aislado de los fluidos metabólicos y se ha establecido su identidad, deben aplicarse algunos criterios adicionales para comprobar su identidad, intermediaria; estos criterios adicionales pueden proporcionar por sí solos suficiente información para comprobar claramente si un determinado compuesto está implicado en una ruta metabólica.

La velocidad a la que un compuesto es degradado debe ser compatible con el grado de oxidación del sustrato de crecimiento. La técnica de adaptación simultánea proporciona un rápido y conveniente ensayo para comprobar la velocidad de oxidación de un sustrato con la del intermediario propuesto, antes de intentar aislar las enzimas de las células intactas.

Cuando una bacteria crecida en un medio rico es trasladada a un medio que contiene como nueva y única fuente de carbono un sustrato determinado, el crecimiento no se reinicia hasta que las células son capaces de metaboli-

zarle en la debida forma. Las células deben, en primer lugar, transportar al interior dicha sustancia y después sintetizar en cantidades suficientes aquellas enzimas que degradan el sustrato rápidamente, para suplir las necesidades del proceso de crecimiento en cuanto a energía y material celular, algunas de estas enzimas usualmente deben ser inducidas o desreprimidas.

Si la bacteria es aerobia, es probable que el sustrato se convierta en metabolitos del TCA y su conversión ocurrirá mediante una secuencia de reacciones consistentes en determinadas etapas enzimáticas. Cuando ocurre el crecimiento a expensas del sustrato, las células poseerán cantidades fuertemente incrementadas de las enzimas que catalizan la secuencia de reacciones intermedias entre este compuesto y los metabolitos del TCA. Ninguno de los compuestos intermediarios se esperaría fuera oxidado fácilmente, por células del cultivo en medio rico antes de que sean expuestas al sustrato inicial. En consecuencia, cuando una suspensión lavada de bacterias crecidas con el sustrato inicial como fuente de carbono, es incubada con éste, o con algún compuesto intermediario de su ruta degradativa, en un respirómetro Warburg o con un electrodo de oxígeno, podremos medir el consumo de oxígeno. Los compuestos intermediarios serían oxidados aproximadamente a la misma velocidad que el sustrato de crecimiento. Sin embargo,

otros compuestos que no sean miembros de la secuencia metabólica, no serían oxidados más que hasta el nivel en que estuvieran almacenados en el interior de la célula o también se conseguiría un rápido consumo de oxígeno sólo cuando las nuevas enzimas fueran inducidas.

Este diseño experimental fue usado por Stanier (1947) para estudiar la degradación bacteriana de compuestos aromáticos.

Ahora bien, esta técnica tiene algunas limitaciones que han sido descritas por el mismo autor. La primera es que, aunque un compuesto sea intermediario de una ruta, puede no ser oxidado por las células si no atraviesa la barrera de permeabilidad celular, es decir, no es transportado al interior. La segunda es que un compuesto puede ser oxidado rápidamente sin ser un intermediario de la secuencia propuesta, ya que las enzimas de su metabolismo pueden ser constitutivas. Tal posibilidad puede ser examinada, midiendo las velocidades de oxidación en células crecidas en varias fuentes de carbono intermediarias.

La primera de estas limitaciones puede ser ilustrada por los resultados de determinadas experiencias que llevaron a Karlsson y Barker (1948) a deducir que el TCA no funcionaba enteramente en Azotobacter agilis, ya que

considerando la secuencia alfa-oxoglutarato ---> Succinato ---> Fumarato ---> Malato ---> Piruvato ---> Acetato, encontraron que, cuando el microorganismo crecía con oxoglutarato, oxidaba rápidamente todos los compuestos; sin embargo, cuando crecía en un intermediario cualquiera, oxidaba rápidamente ese compuesto y los posteriores, pero los anteriores lo hacía solo después de un largo periodo de tiempo. Stone y Wilson (1952) encontraron que, aunque células enteras no eran capaces de oxidar estos compuestos, los extractos bacterianos sí lo eran. Por ello concluyeron que las enzimas del TCA están presentes dentro de las células, pero son inaccesibles a determinados metabolitos, que están localizados fuera de ella y sólo cuando su sistema de transporte haya sido inducido podrán penetrar y ser oxidados.

La segunda limitación de la técnica de adaptación simultánea, se ilustra con el trabajo de Wheelis y col. (1967) sobre el metabolismo en el ácido benzoico en Pseudomonas testosteroni. Este organismo hidroxila el benzoato primero en el carbono 3, dando m-hidroxibenzoato, y después en el carbono 4, para originar protocatecato, el núcleo del cual es escindido por una oxigenasa. En principio, el m-hidroxibenzoato podría haber sido convertido alternativamente a ácido gentísico por hidroxilación en carbono 6, una reacción que cumple P. acidovorans cuando

metaboliza este compuesto. Sin embargo, P. testosteroni no puede hidroxilar el carbono 6, por lo cual no puede usar la ruta alternativa del gentisato. Esto se demuestra por el hecho de que un mutante carente de 4-hidroxilasa no crece en benzoato o m-hidroxibenzoato, aunque si lo hace rápidamente con p-hidroxibenzoato. Sin embargo, y a pesar de no ser usadas para el metabolismo del m-hidroxibenzoato, tres enzimas de la ruta del gentisato están presentes en P. testosteroni y son inducidas a altos niveles al exponerlas a m-hidroxibenzoato.

En el metabolismo del propionato de Moraxella lwoffii (Hodgson y McGarry, 1968a) y de E. coli K₁₂ cepas K_I y K_{II} (Kay, 1972), utilizando técnicas respirométricas de consumo de oxígeno, se pudo llegar a proponer que el acetato era un intermediario en la degradación de propionato, ya que las células crecidas en propionato oxidan ambos compuestos y células crecidas en acetato sólomente oxidan este sustrato, transportándose ambos por el mismo sistema.

Con respecto a la denominación de esta técnica hemos usado la original de Stanier (1947), aunque no sea completamente adecuada. Así, adaptación simultánea se refiere a un hecho experimental, dado que cuando las células han ajustado su complemento enzimático para un sustrato, rápidamente le oxidan y simultáneamente serán capaces de

oxidar los intermediarios; sin embargo, ésto no implica que el ajuste sea provocado. Por otro lado, la denominación alternativa, inducción secuencial, implica un mecanismo de acondicionamiento que frecuentemente no ocurre; las enzimas degradativas de los compuestos intermediarios no son necesariamente sintetizadas secuencialmente: pueden ser desreprimidas coordinadamente y no ser el responsable ninguno de estos compuestos.

II. 1.5. Empleo de extractos libres

El conocimiento de una ruta degradativa utilizando extractos bacterianos libres de células, se basa en el hecho de que las enzimas son, generalmente, solubles e inducibles y pueden determinarse y compararse las actividades enzimáticas de células crecidas en diferentes fuentes de carbono. El método es particularmente interesante si todas las enzimas, que catalizan una serie de reacciones sucesivas en una secuencia, se pueden extraer simultáneamente; así, si el segmento mayor de una reacción "cadena" permanece funcional después del proceso de extracción celular, se puede obtener información sobre la ruta, bloqueando la secuencia en diferentes puntos. Esta acción puede ser realizada inactivando alguna de las enzimas por inhibidores ó por tratamiento térmico ó sometiendo los extractos celulares a un proceso de diálisis con objeto de separar

los coenzimas esenciales. Estos extractos también pueden ser fraccionados por precipitación con sulfato amónico ó a través de cromatografía de filtración en gel. Por otra parte, la extracción de un conjunto de enzimas que actúan secuencialmente puede permitir la biosíntesis "in vitro" de un metabolito, que se puede aislar de la mezcla de reacción y posteriormente caracterizar. Este intermediario metabólico debe sintetizarse y degradarse a velocidades compatibles con la velocidad total de conversión del sustrato de crecimiento en su(s) producto(s) final(es) del metabolismo. Debe tenerse en cuenta que algunas enzimas solubles de los extractos crudos no poseen necesariamente la misma actividad en el tubo de ensayo que en el interior de las células: por ejemplo, cuando la actividad depende de una determinada asociación de las subunidades de la enzima, al diluir los extractos la efectividad catalítica se puede reducir drásticamente.

Las ventajas de utilizar extractos libres de células, que catalizan reacciones sucesivas en una secuencia catabólica, han sido puestas de manifiesto en un gran número de investigaciones bioquímicas. Concretamente en el metabolismo del propionato en tejidos animales, Flavin y col. (1955, 1956, 1957), Kaziro y Ochoa (1964), demuestran la presencia de las enzimas que catalizan la transformación de propionil-CoA en succinato. Asimismo, Callely y

Lloyd (1964) en extractos bacterianos de P. zopfii determinan actividades de propionil-CoA deshidrogenasa, acrilil-CoA hidratasa, β -hidroxipropionil-CoA desacilasa, β -hidroxipropionato deshidrogenasa y semialdehído malónico descarboxilasa, que les lleva a sugerir que la ruta degradativa del propionato transcurre via semialdehído malónico; de la misma forma Rabin y col. (1965), Megraw y col. (1965a y b), Reeves, Urbano y Ajl (1965), Wegener, Reeves y Ajl (1967a y b; 1968a y b), Hodgson y McGarry (1968a y b), Wegener y col. (1969) y Kay (1972), utilizan este procedimiento de determinación de las actividades en extractos celulares para proponer una ruta catabólica del propionato.

En un principio, cuando se observó que una enzima era fuertemente desreprimida como consecuencia de utilizar las bacterias diferentes fuentes de carbono, se adoptó que la enzima funcionaría en el catabolismo de un nuevo sustrato de crecimiento. Esta hipótesis estaba basada en el hecho de que la bacteria no sobreviviría al proceso selectivo de evolución si los sustratos no indujeran la síntesis de proteínas no utilizables en condiciones favorables de crecimiento. Actualmente, es un hecho comprobado que cuando las bacterias se exponen a una nueva fuente de carbono pueden sintetizar enzimas, que normalmente no utilizan, junto con aquellas que sintetiza cualquiera que sea el sustrato de crecimiento.

En 1966, Ornston y Stanier purificaron y estudiaron las propiedades de las enzimas implicadas en las rutas catabólicas de los ácidos benzoico y 4-hidroxibenzoico. Ambas rutas transcurren por vías separadas confluyendo en el ácido beta-oxoadípico enol-lactona, el cual por medio de una hidrolasa se transforma en ácido beta-oxoadípico. En Pseudomonas putida, Ornston (1966) demostró que el ácido beta-oxoadípico o su acil-CoA correspondiente es el desrepressor de la hidrolasa. El problema de como el ácido benzoico se podría convertir en ácido beta-oxoadípico sin que se produjera una acumulación del ácido beta-oxoadípico enol-lactona pudo ser resuelto al observar que las enzimas de la ruta se encuentran presentes a niveles basales y cuando las células son expuestas al ácido benzoico hay una lenta pero significativa formación de ácido beta-oxoadípico, suficiente para iniciar la desrepresión de la beta-oxoadipato enol-lactona hidrolasa. Simultáneamente a este proceso, se produce la síntesis de dos enzimas de la ruta degradativa del ácido 4-hidroxibenzoico. Esta desrepresión coordinada de dos rutas diferentes, también ha sido observada en algunas especies de Moraxella (Cánovas y col., 1967), aunque en el caso concreto de las rutas degradativas de los ácidos 4-hidroxibenzoico y benzoico, los mecanismos de desrepresión son diferentes.

Otro caso interesante es el propuesto por Wege-

ner, Reeves y Ajl (1968a) para el metabolismo del propionato. Cuando las células de E. coli utilizan este compuesto como fuente de carbono es esencial la actividad propionil-CoA carboxilasa en la fase de adaptación. Una vez que se supera un cierto nivel de crecimiento, se encuentra implicada la isocitrato liasa del ciclo del glioxilato. Posteriormente, Wegener, Vanderwinkel, Reeves y Ajl (1969) comprobaron que la actividad de esta enzima durante el crecimiento sobre propionato varía con respecto a la cepa de E. coli empleada, la concentración de propionato y de sales minerales en el medio y la fase de crecimiento.

También Kay (1972) en E. coli K₁₂ cepas K_I y K_{II} sugiere que el catabolismo del propionato transcurre simultáneamente a través de las rutas del alfa-hidroxiglutarato via succinato y del lactato via acrilato.

Aunque estos hechos no son muy corrientes, en el estudio de las rutas catabólicas utilizando extractos libres de células debe tenerse en cuenta que el aislamiento y caracterización de un metabolito sintetizado "in vitro" por extractos crudos de células crecidas en el sustrato inductor no establece per se que el metabolito pertenezca a la ruta catabólica directa del sustrato de crecimiento.

II. 1.6. Utilización de isótopos radioactivos

En 1964, Krebs refiriéndose a la aplicación de isótopos radioactivos escribía: "Una ventaja de la utilización de isótopos radioactivos es su aplicabilidad a sistemas complejos tales como organismos vivos y tejidos íntactos en condiciones fisiológicas. Pero hay un precio que pagar. Lo que se gana por mantener unas condiciones fisiológicas se pierde en parte por las dificultades que se presentan al interpretar los resultados". En el caso concreto de los sistemas bacterianos se podría señalar que algunas de estas dificultades se pueden evitar al trabajar en condiciones experimentales favorables, como son la utilización de medios mínimos y el crecimiento en fase exponencial. Sin duda, porque la biosíntesis es el aspecto más sobresaliente del metabolismo en el mundo bacteriano, las técnicas de radioisótopos han sido extensivamente utilizadas en el conocimiento de las rutas biosintéticas y relativamente poco en las rutas catabólicas.

Un procedimiento, que viene empleándose desde el comienzo de los años cincuenta, para identificar un metabolito marcado radioactivamente consiste en añadir un exceso de metabolito sin marcar, el cual actúa como un portador y al recuperarse nuevamente el metabolito se observa que contiene radioactividad. Cuando este método se

aplica a bacterias intactas deben tomarse precauciones a la hora de interpretar los resultados, ya que el metabolito sin marcar puede no mezclarse con el marcado formado endógenamente, bien por su naturaleza química o bien porque no ha podido atravesar la membrana.

Uno de los resultados más importantes que se obtuvieron de la aplicación de esta técnica fue el descubrimiento del "ciclo del ácido dicarboxílico". Los experimentos que probaron la operatividad de esta ruta fueron realizados con suspensiones celulares no proliferantes de Micrococcus lysodeikticus. Las suspensiones oxidaban el acetato marcado con ^{14}C en el grupo metilo; el alfa-oxoglutarato y el succinato se recuperaron con radioactividad después de haberse agregado dichos compuestos en exceso a la mezcla de reacción; sin embargo, las actividades específicas de los átomos de carbono del alfa-oxoglutarato eran más bajas que las del succinato. Este resultado no concordaba con el hecho de que el alfa-oxoglutarato fuera el inmediato precursor del succinato como sucede en el ciclo de Krebs. Además, la actividad específica del CO_2 liberado era varias veces mayor que la de los átomos de estos grupos carboxilos de ambos compuestos. Sin embargo, estos datos estaban de acuerdo con la hipótesis de la condensación de Thunberg: $2 \text{ acetato} \rightarrow \text{succinato} + 2 \text{ H}$; una cantidad muy pequeña de acetato marcado se incorpora al

portador alfa-oxoglutarato, sugiriendo que este compuesto no es un intermediario obligatorio en la oxidación del acetato, mientras se incorporan cantidades relativamente altas en los grupos metilos del succinato. Sin embargo, experimentos isotópicos, rigurosamente controlados, realizados por Swim y Krampitz (1954) pusieron de manifiesto la dificultad de interpretación de los resultados obtenidos, que ocasionaban en muchas ocasiones conclusiones contradictorias. Por ello los investigadores decidieron utilizar los radioisótopos sobre bacterias en la fase de crecimiento exponencial en vez de suspensiones celulares no proliferantes y por medio de dos técnicas principalmente: "Competición isotópica" y "Muestreo rápido".

En la técnica de competición isotópica se considera la formación de un compuesto estable a partir de un sustrato marcado radioactivamente. Si en un momento determinado el sustrato se diluye por adición al medio de cultivo de sustrato sin marcar, la actividad específica de los compuestos intermediarios, así como la del producto final, disminuirá. Si el compuesto, que se añade al medio de cultivo, es el producto final sin marcar, la actividad específica de éste tendrá un valor más bajo, pero no así las actividades específicas de los compuestos precursores que se mantendrán constantes. Esta técnica se aplica con éxito cuando la ruta metabólica es unidireccional y el producto

final es estable, de forma que la radioactividad incorpora da no se puede reciclar. Tales condiciones se pueden encontrar cuando el producto es un coenzima cuya efectividad funcional depende de su estabilidad metabólica o es un aminoácido que permanece estable y se incorpora a la proteína en las condiciones normales de crecimiento.

Los primeros investigadores que utilizaron esta técnica fueron Roberts y col. (1955), que comprobaron que en E. coli, el TCA actúa tanto en la biosíntesis como en la oxidación de los aminoácidos. Posteriormente, esta técnica también fue aplicada con éxito por Cox y Gibson (1966) en el estudio de las rutas biosintéticas de compuestos aromáticos, y por Leistner y col. (1967) en la de la vitamina K₂.

La técnica de rápido muestreo de incorporación de radioactividad posee la ventaja de que puede seguirse la cinética de incorporación. La aplicación de esta técnica se asemeja, y en ocasiones coadyuva, a la de adaptación simultánea, por lo que la aplicación de ambas técnicas proporciona una idea general de la secuencia de la ruta. Las aplicaciones más efectivas o interesantes sobre el metabolismo bacteriano fueron realizadas por Kornberg (1963) y Quayle (1963a y b). De forma general después de la aplicación de estas técnicas se realizan estudios enzimológicos

por medio del aislamiento y caracterización de enzimas que catalizan las reacciones propuestas y medidas de las velocidades de las reacciones para confirmar que la secuencia multienzimática puede llevarse a cabo a una velocidad que se encuentra en consonancia con la velocidad metabólica total.

La idea de que la velocidad a la que un compuesto se degrada sea compatible con el grado de oxidación de un sustrato ha sido puesta en práctica por Wegener, Reeves y Ajl (1967a y b) y Wegener, Reeves, Rabin y Ajl (1968b) en la elucidación de la ruta degradativa del propionato en E. coli, siguiendo la evolución de $^{14}\text{CO}_2$ en ensayos respirométricos. Estos investigadores pensaron que la procedencia del carbono marcado sería un signo indicativo de la ruta a seguir en la degradación de este compuesto. En sus experimentos observaron que el porcentaje de acumulación de $^{14}\text{CO}_2$ era mayor cuando el 1- ^{14}C propionato se usaba como sustrato que cuando utilizada el 2- ^{14}C propionato y éste mayor que cuando se usaba el 3- ^{14}C propionato. Estos datos eran consistentes con una ruta de oxidación de propionato a lactato via acrilato, ya que de las cinco rutas que habían sido propuestas en microorganismos por otros autores, Wegener y col. previeron que la evolución del $^{14}\text{CO}_2$ según la ruta degradativa del propionato marcado específicamente debería seguir el siguiente patrón: α -hi

droxiglutarato a succinato ($1 \rightarrow 3 = 2$); carboxilación a succinato ($1 \rightarrow 3 = 2$); malónico semialdehído-CoA ($3 \rightarrow 1 \rightarrow 2$); malónico semialdehído ($1 \rightarrow 3 \rightarrow 2$) y lactato ($1 \rightarrow 2 \rightarrow 3$).

II. 1.7. Aislamiento y caracterización de mutantes defectivos en la ruta

En la naturaleza se encuentran muchos microorganismos que son incapaces de crecer a menos que se le provea de ciertos factores esenciales de crecimiento (aminoácidos, coenzimas), debido a un fallo metabólico, en comparación con organismos competentes. Estos microorganismos nutritivamente exigentes o auxótrofos naturales han sido usados para el estudio de las rutas biosintéticas de los aminoácidos y para descubrir, ensayar y aislar coenzimas, así como para dilucidar sus estructuras químicas y su función. Así podemos destacar la dilucidación de la estructura química y la función biológica del ácido lipoico (O'Kane y Gunsalus, 1948; Gunsalus y col., 1952a y b; Guirard y col., 1946a y b; Stokstad y col., 1949; Kidder y Dewey, 1949), lo cual permitió su aislamiento cristalizado a partir de hígado (Reed y col., 1953) y su síntesis (Hornberger y col., 1953).

Un segundo ejemplo es la demostración de que el factor requerido para las descarboxilaciones y otras reac-

ciones de aminoácidos es el piridoxal fosforilado sobre el grupo hidroximetilo en posición I, según los trabajos de Bellamy y Gunsalus (1944), Gunsalus y col. (1944) y Umbreit y Gunsalus (1949) sobre Streptococcus faecalis.

Por último, merece citarse la información que los auxótrofos naturales han proporcionado sobre el coenzima A. Utilizando bacterias que no pueden sintetizar ácido pantoténico, pero si convertirlo en CoA, y bacterias que no pueden realizar esta conversión, pero si usar pantoteína, se ha podido ver que la biosíntesis del CoA, a partir de ácido pantoténico, implica fosforilación, extensión de la molécula por adición de un residuo de α -mercaptoetilamina para dar pantoteína-4 fosfato, la cual se combina con ATP y se fosforila dando CoA.

Actualmente, además de los auxótrofos naturales apropiados, se usan mutantes inducidos obtenidos por exposición de los organismos de tipo silvestre a la radiación ultravioleta o a mutágenos químicos y su posterior selección por medio, por ejemplo, de penicilina (Lederberg y Zinder, 1948).

Los métodos empleados, con la utilización de mutantes, en la determinación de rutas metabólicas proporcionan grandes posibilidades aunque este tipo de investiga-

ción presenta algunas limitaciones y por ello la interpretación de tales estudios debe ser cauta. Por este motivo, una vez analizados por metodología de mutantes las reacciones de la ruta, deben estudiarse individualmente las enzimas, que proporcionaran información, no solamente sobre el camino a seguir, sino también sobre su regulación. Consideremos una ruta metabólica general, compuesta por una secuencia de reacciones por las cuales una bacteria tipo silvestre sintetiza un aminoácido a partir de una fuente de carbono. Los mutantes deficientes en la síntesis de una enzima de un paso intermedio no crecerán con los compuestos anteriores en la secuencia. Sin embargo, los compuestos posteriores al paso bloqueado si servirán para permitir el crecimiento. Si es posible obtener mutantes en cada uno de los pasos y analizar sus requerimientos, se podrá sugerir una ruta a partir del compuesto inicial. Además, el conocimiento de las reacciones de una ruta está apoyado por el hecho de que cuando un determinado mutante crece con los compuestos inicial y final de la ruta, se acumulará el compuesto anterior a la mutación. Este poder de acumulación, en principio, comporta consecuencias metabólicas adicionales. Como se ha indicado, el estudio de las enzimas implicadas por separado nos permitirá demostrar su viabilidad.

La aplicación de estos métodos ha proporcionado

resultados satisfactorios en la investigación de las rutas biosintéticas de valina e isoleucina en Neurospora crassa (Bonner y col., 1943). Estudios complementarios de Umbarger y col. (1960) en E. coli y A. aerogenes y de Satyanarayana y Radhakrishnan (1962) en hojas de espinacas sobre el resto de las enzimas de las rutas, llevaron a la conclusión de que las mismas enzimas sirven para catalizar las reacciones respectivas en las rutas biosintéticas de valina e isoleucina.

Otro de los ejemplos más claros que ilustran la metodología mutante, y particularmente provechoso en descubrir nuevos metabolitos, es la elucidación de rutas de biosíntesis de compuestos aromáticos (Davis, 1950 y 1951; Salamon y Davis, 1953; Weiss y col., 1953; Gibson y Gibson, 1964).

Los trabajos de estos investigadores en la biosíntesis aromática proporcionan cuatro ejemplos de hallazgos experimentales que requieren prudencia en su interpretación:

- 1.- Se puede encontrar un requerimiento para un compuesto que no sea un precursor (Mitsushashi y Davis, 1954).
- 2.- Un intermediario obligatorio en la síntesis puede no

satisfacer los requerimientos de crecimiento (Davis y Mingioli, 1953).

3.- Un compuesto puede acumularse en los cultivos en respuesta a una lesión metabólica y no ser un intermediario (Levin y Sprinson, 1960 y 1964).

4.- Un precursor puede dar origen a un requerimiento de crecimiento cuando es añadido al cultivo (Davis, 1952a y b).

La metodología mutante no sólomente ha sido utilizada con éxito en el aspecto biosintético del metabolismo sino también en las rutas degradativas y en la elucidación de reacciones en las rutas centrales del metabolismo. El TCA y la glicolisis, sirven como procesos intermedarios para diversas reacciones en distintas rutas, tanto biosintéticas como degradativas. Como resultado de esta interrelación de secuencias, la situación puede aparecer compleja siendo posible dibujar varios esquemas alternativos y factibles para convertir un metabolito en otro por medio de enzimas que, se conoce, contiene el organismo. Ahora el problema se plantea al intentar demostrar cual de las rutas es la empleada en una situación determinada. A veces, es posible mostrar que, si bien una enzima está presente, su concentración es insuficiente para producir

la velocidad de conversión observada.

Sin embargo, no se puede tomar una decisión definitiva únicamente sobre esta base. La determinación de niveles enzimáticos puede simplemente indicar que, en principio, pueden ser utilizadas rutas alternativas. Los metabolitos de las rutas centrales del metabolismo suelen servir como intermediarios de otras rutas y establecen interrelaciones entre varias secuencias. En este aspecto, merece especial atención el fosfoenolpiruvato, ya que además de estar implicado en el PTS, y servir de origen de varias rutas biosintéticas, se encuentra en un punto clave del metabolismo de los carbohidratos: entre la glicolisis y el ciclo de Krebs.

Cuando Escherichia o Salmonella crecen utilizando glucosa como fuente de carbono el fosfoenolpiruvato (PEP) se forma directamente por las reacciones de la secuencia glucolítica y por acción de la piruvato quinasa se transforma en piruvato. Dos piruvato quinasas han sido aisladas en estos microorganismos potencialmente capaces de llevar a cabo dicha reacción (Malcovati, Valentini y Kornberg, 1973; Alonso, G-Olalla y Garrido-Pertierra, 1979) y mutantes defectivos en ambas piruvato quinasas han sido obtenidos por Garrido-Pertierra y Cooper (1976). El PEP también puede formarse a partir de OAA por la enzi-

ma fosfoenolpiruvato carboxiquinasa, enzima gluconeogénica que une el ciclo de los ácidos tricarboxílicos con la ruta glucolítica. La reacción inversa es catalizada por la fosfoenolpiruvato carboxilasa. Los mutantes defectivos de esta enzima, obtenidos por Theodore y Englesberg (1964), son incapaces de crecer en compuestos glucolíticos. Canovas y Kornberg (1965) y Maeba y Sanwal (1969) observaron que la enzima bacteriana era alostérica y como efector positivo requería CoA, diferenciándose en este aspecto de la enzima que cataliza la misma reacción en plantas. Esta reacción es de gran importancia por su función anaplerótica, cuando los metabolitos del ciclo son utilizados para la biosíntesis de constituyentes celulares.

Una tercera reacción por la que se puede obtener PEP es directamente a partir de piruvato; reacción catalizada por la enzima fosfoenolpiruvato sintetasa y restrictiva a algunas bacterias y plantas que utilizan la ruta de Hatch-Slack. Cooper y Kornberg (1965 y 1967) demostraron la presencia de la enzima en E. coli y que la energía necesaria para llevar a cabo tal transformación procede de la hidrólisis del ATP.

La importancia de la metodología mutante en el estudio del metabolismo bacteriano puede ser resaltado por el siguiente hecho: se observa que existen dos vías alter-

nativas por las que las células son potencialmente capaces de obtener fosfoenolpiruvato desde intermediarios del ciclo de Krebs. La primera, directamente a partir del oxalacetato por la enzima fosfoenolpiruvato carboxiquinasa y la segunda transformando el malato en piruvato y éste en PEP, reacciones en que están implicadas la enzima "málico" y la fosfoenolpiruvato sintetasa respectivamente. Las tres enzimas han sido encontradas en extractos celulares de Escherichia coli y Salmonella typhimurium. Sin embargo, "in vivo" la ruta metabólica a partir de intermediarios del ciclo está canalizada exclusivamente por la primera vía ya que los mutantes defectivos en fosfoenolpiruvato carboxiquinasa aislados por Hsie y Rickenberg (1966) no crecen en medios que utilizan únicamente succinato, fumarato o malato como fuente de carbono.

También en el metabolismo del propionato ha sido aplicada la metodología mutante. En E. coli E-26 (Wegener, Reeves y Ajl, 1968b) utilizando un mutante defectivo en el catabolismo del valerato proponen que la secuencia degradativa del propionato transcurre vía α -hidroxiglutarato; Kolodziej y col. (1968) utilizando un mutante defectivo en las enzimas de carboxilación apoyan esta hipótesis. En la misma especie microbiana, cepa W (Ashworth y Kornberg, 1964), emplean mutantes isocitrato liasa negativos y sugieren la ruta de oxidación directa del propionato pa-

ra su catabolismo. En E. coli K₁₂ cepas K_I y K_{II}, Kay (1972) aisla mutantes que han ganado la capacidad de crecer en propionato y los utiliza en el estudio de la ruta degradativa de este compuesto a través de métodos enzimológicos y respirométricos.

II. 2. Objetivos del presente trabajo de investigación

Como se ha esbozado en el Introducción y teniendo en cuenta las Consideraciones Teóricas, el objetivo del presente trabajo de investigación es el estudio de la vía degradativa del propionato en Salmonella typhimurium LT2.

La importancia de estas investigaciones reside, por una parte, en contribuir al conocimiento de las capacidades bioquímicas de esta especie bacteriana, en particular, y al proceso de gluconeogénesis y por otra la información obtenida podrá servir como modelo aplicable al estudio del catabolismo de propionato en otros organismos.

III. MATERIALES Y METODOS

III. MATERIALES Y METODOS

III. 1. Materiales

III. 1.1. Reactivos y productos

Etil metano sulfonato, 2-Aminopurina, timina, trimetoprim, fenacina metasulfato, clorhidrato de fenilhidracina, 2-4 dinitrofenil hidracina, ATP, NAD, NADP, NADH, FAD, PEP, 2-6 diclorofenol indofenol, azul de nitrotetrazolio, trifenil tetrazolio, clorhidrato de hidroxilamina, clorhidrato de cisteina, acetil fosfato, propionil fosfato, Coenzima A, acetil-CoA, n-propionil-CoA, albúmina sérica bovina, diaforasa y los ácidos glioxílico, α -hidroxiglutarico, pirúvico, DL-láctico y DL-isocítrico, se obtuvieron de Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri, USA.

Anhídrido propiónico, 5-5' ditiobis-2 nitrobenzoico fueron proporcionados por Aldrich Europe, BEERSE, Bélgica.

Bacto-agar, bacto-casitona, extracto de levadu-

ra, bacto-triptona y medio nutritivo fueron suministrados por DIFCO Laboratories, Detroit, Michigan, USA.

Tris (hidroximetil)-aminometano, D-glucosa, D-lactosa, D-galactosa, D-xilosa, glicerol, Vitamina B₁, Vitamina B₁₂, leucina, piridina, EDTA, 2-2' tiodiglicol, verde de bromo cresol, azul de metileno, tampón imidazol, cromatofolios de silicagel 60 F₂₅₄, los ácidos acético, cítrico, succínico, acrílico, propiónico, p-hidroxifenilacético, γ-aminobutírico y laúrico, y todos los demás reactivos de grado analítico se adquirieron de Merck, Darmstadt, R.F.A.

Malato deshidrogenasa y lactato deshidrogenasa se obtuvieron de Boehringer Mannheim GmbH, R.F.A.

Sephacryl S-200 y DEAE-Sephacel se consiguieron de Pharmacia Fine Chemicals A.B., Uppsala, Suecia, y la penicilina sódica de Antibióticos S.A., León, España.

III. 1.2. Material biológico

Los organismos utilizados fueron: Megasphaera elsdenii, Escherichia coli K₁₂ cepa X₂₈₉, E. coli cepa B y Salmonella typhimurium cepa LT2; así como los mutantes de este último organismo AG 517, A₁, 4017, B₁, I8 y leu

39 y un conjunto de cepas F'.

Las cepas de E. coli y S. typhimurium han sido proporcionadas por el Dr. Cooper, Department of Biochemistry, University of Leicester (Inglaterra), el cual, a su vez, obtuvo el conjunto de cepas F' del E. coli Genetic Stock Centre, University of Yale (USA). M. elsdenii ha sido suministrada por la Colección Española de Cultivos Tipo, Departamento de Microbiología, Universidad de Valencia (España).

Las estirpes han sido conservadas en placas con medio completo sólido, a 4°C y han sido renovadas cada 20 días para su perfecto mantenimiento. Semestralmente se ha realizado una biotipificación a nivel de especie.

III. 2. Métodos

III. 2.1. Medios de cultivo

Se han empleado medios líquidos y medios sólidos para los cultivos bacterianos de acuerdo con los fines que se persiguen en las investigaciones.

III. 2.1.1. Medios líquidos

Los medios líquidos se han utilizado bien en forma mínima o bien en forma completa, según se desee obtener células crecidas en una fuente única y conocida de carbono o en un conjunto completo de nutrientes, respectivamente.

III. 2.1.1.1. Medios líquidos mínimos

Los medios mínimos contienen un conjunto de sales minerales y requerimientos básicos a los cuales se añade la fuente de carbono y energía que deseemos. Los utilizados fueron dos: M-63 y medio de Reeves y Ajl.

Las distintas fuentes de carbono se prepararon 0'5 M, su pH se ajustó a 7'0 y se almacenaron, una vez esterilizadas a 4°C. Para su utilización se añadieron al medio mínimo en una cantidad estándar "60C", número que resulta de multiplicar la concentración por el número de átomos de carbono del compuesto; así en el caso de hexosas, la concentración final era 10 mM; succinato 15 mM; lactato, glicerol, piruvato y propionato 20 mM; acetato 30 mM, etc.

Todos los azúcares sencillos utilizados corres-

ponden al isómero D.

III. 2.1.1.1.1. Medio M-63

Es un medio descrito por Miller (1972). Un litro de M-63 contiene: 13'6 g de KH_2PO_4 , 2 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0'5 mg de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y 1'0 mg de vitamina B_1 . El pH de la solución se ajusta a 7'0 con KOH.

Se prepara una disolución 0'1 M de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ de la cual se añade 1 ml por cada 100 ml de M-63.

El M-63 se preparó usualmente en forma concentrada 5X y se diluyó inmediatamente antes de esterilizar para su uso.

III. 2.1.1.1.2. Medio de Reeves y Ajl (1960)

Este medio contiene: 0'4% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0'6% de KH_2PO_4 , 0'2% de K_2HPO_4 , 0'01% de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y 0'2% de extracto de levadura. El pH es ajustado a 7'0 con KOH.

En algunas ocasiones, y con el propósito de realizar crecimientos más rápidos y evitar contaminaciones, estos medios mínimos fueron suplementados con cantidades pequeñas de los medios completos que a continuación se des

criben.

III. 2.1.1.2. Medios líquidos completos

Se han utilizado los medios completos, descritos por Miller (1972), que a continuación se indican:

- 1.- Medio Luria (LB): contiene 10 g de bacto-triptona, 5 g de bacto-extracto de levadura, 0'5 g de NaCl y 2 ml de NaOH 1M en un volumen final de 1 litro. El pH se ajusta a 7'0 con NaOH 1M.
- 2.- Caldo nutritivo (NB): contiene 8 g de Medio Nutritivo por litro.
- 3.- Medio R: contiene por litro, 10 g de bacto-triptona, 1 g de bacto-extracto de levadura y 8 g de NaCl. El pH se ajusta a 7'0 con NaOH 1M.
- 4.- Extracto de levadura (Y): contiene 15 g de bacto-extracto de levadura por litro.

Los medios completos descritos se prepararon al 1'5% (p/v) cuando se emplearon como suplemento del medio mínimo.

En todos los casos, los medios completos se esterilizaron inmediatamente una vez preparados y se conservaron a 4°C.

III.2.1.2. Medios sólidos

Se prepararon añadiendo a los medios líquidos 15 gramos de bacto-agar por litro.

Para la preparación de placas, todos los medios líquidos y el agar se prepararon y esterilizaron por separado, mezclándose inmediatamente después y suplementándose con la fuente de carbono deseada (en caso de ser medio mínimo); esta mezcla se vertió en placas Petri estériles desechables, a razón de 25 ml por placa; éstas se dejaron en la estufa de cultivo a 37°C durante 12 horas con objeto de eliminar el agua de condensación y comprobar su esterilidad. Posteriormente, debidamente selladas y rotuladas, se almacenaron a 4°C hasta su utilización.

III.2.2. Medios de mutación

Los medios utilizados para la obtención de mutantes fueron: el M-63, anteriormente descrito (Sección III.2.1.1.1.1.), y el M-121, descrito por Gorini y Kaufman (1960). Este último contiene: 3 g de KCl, 9'4 g de NaCl, 48'4 g de $(\text{OH})_3\text{NH}_2\text{C}$, 20 ml de MgCl_2 0'1 M, 0'02 ml de FeCl_3 0'2 M, 0'7 g de Na_2SO_4 y 1'4 mg de ZnCl_2 . Las sales se disuelven en 500 ml de H_2O destilada, se ajusta el pH a 7'5 con HCl 1 M y se añaden 2'15 g de NH_4Cl y 44'4 mg de CaCl_2 , llevándo-

se a un volumen final de 1 litro con agua destilada.

III. 2.3. Agentes mutagénicos

Los agentes mutagénicos utilizados fueron EMS y 2-AP. Su interés reside en que producen cambios de base pero no delecciones ni inserciones.

En ninguno de los dos casos es preciso esterilizar las soluciones de dichos compuestos.

III. 2.3.1. Etil metano sulfonato (EMS)

El EMS fue utilizado dada su gran potencia mutagénica debida a su acción molecular que provoca la unión de grupos etilo a las moléculas de guanina del ADN en el carbono 7, provocando la pérdida de estas bases y apareciendo un sitio vacío. El resultado final conduce a transiciones o transversiones según la base que ocupe dicho sitio. En el caso de no perderse la guanina alquilada, ésta aparea erróneamente con la timina produciéndose la transición: G-C ---→ A-T. Así pues, el efecto del EMS es visible después de la replicación del ADN.

Para el ensayo mutagénico, el EMS se utilizó sin diluir y usando material desechable debido a ser potencial

mente cancerígeno; por ello con una pipeta de punta desechable se tomaron 0'03 ml de EMS y se añadieron a 2 ml de la suspensión celular, en medio de Gorini M-121 (ó M-63), sin fuente de carbono y con agitación lenta.

III. 2.3.2. 2-Aminopurina (2-AP)

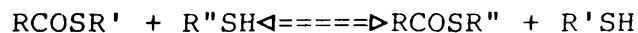
La 2-AP produce transiciones en el ADN, y aunque resulta menos potente que otros agentes como EMS o Nitrosoguanidina (NG), este efecto se supera creciendo las bacterias durante varias generaciones en su presencia.

Para el ensayo mutagénico, 3 mg de 2-AP se añadieron a un frasco que contiene 5 ml de medio completo Luria (LB) y 0'1 ml de un cultivo en fase logarítmica diluido 10^6 veces. Dicha suspensión se dejó crecer hasta alcanzar la fase estacionaria.

III. 2.4. Síntesis química de derivados de Coenzima A

Se realizó según Stadtman (1957b), el cual describe dos métodos para la síntesis de acilos de CoA y otros tiol ésteres. El primero está basado en el procedimiento de Simon y Shemin (1953) e implica los anhídridos de ácido los cuales reaccionan con el mercaptano en solución acuosa a 0°C y pH 7'5. El segundo, desarrollado por Wieland y

Köppe(1953, 1954), y conocido como el método de anhídridos mixtos, se basa en reacciones de intercambio del tipo:



III. 2.4.1. Reacción con anhídridos: síntesis de Acetil-CoA y Propionil-CoA.

A 10 μ mol de CoASH se le añade 1'0 ml de agua destilada; la solución se enfría a 0°C, se le añaden 0'2 ml de KHCO_3 1M y ajusta el pH a 7'5; posteriormente se le añaden 0'13-0'15 ml de una solución recién preparada del anhídrido de ácido 0'1 M (anhídrido propiónico ó anhídrido acético) a 0°C. Se agita a mano durante unos segundos y se deja nuevamente a 0°C durante 4-5 minutos.

Si una gota de la mezcla da positivo el test del nitroprusiato para -SH se le añade más solución del anhídrido de ácido hasta que la reacción sea negativa.

III. 2.4.2. Reacción de anhídridos mixtos: síntesis de acrilil-CoA

En un matraz esférico de 10 ml de capacidad provisto de un tubo con cloruro cálcico, se echan 4'86 mg de ácido acrílico ($6'76 \times 10^{-5}$ moles) disueltos en 3 ml de éter anhidro y se coloca en un agitador magnético. La diso

lución se enfría a 0°C y se añaden, poco a poco y con agitación, procurando que la temperatura no suba, 7'32 mg de cloroformiato de etilo disueltos en 1 ml de éter anhidro, manteniéndose en estas condiciones durante una hora. Pasado este tiempo se añaden de una vez, 40 mg de CoASH ($5'2 \times 10^{-5}$ moles) disueltos en 3 ml de KHCO_3 0'2 M. Se mantiene la agitación durante media hora a temperatura ambiente; a continuación se decanta y la fase acuosa se lava repetidas veces con éter. El acrilil-CoA permanece en la fase acuosa.

III. 2.4.3. Comprobación de la pureza de los acil-CoA sintetizados

La pureza de los acil-CoA se comprobó por medio del método del Nitroprusiato, el método del DTNB y cromatografía en capa fina.

III. 2.4.3.1. Método del nitroprusiato

Descrito por Stadtman (1957b) es un ensayo cuantitativo para grupos -SH libres. En una cubeta de 1 ml se ponen 0'4 ml conteniendo 0'03-0'2 μ equivalentes del acil-CoA correspondiente, 0'4 ml de solución de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ saturada, 0'2 ml de reactivo de nitroprusiato al 2% y 0'2 ml de reactivo de cianuro (20'7 g de K_2SO_3 y 0'33 g

de NaCN en 100 ml de H_2O). Pasados 30 minutos se lee la absorbancia a 540 nm frente a un blanco que contiene todos los reactivos excepto el compuesto con grupos -SH. La densidad óptica obtenida con 1 μ equivalente de -SH libre es 0'33.

III. 2.4.3.2. Método del ácido 5-5' ditiobis-2 nitrobenzoico (DTNB)

El ácido 5-5' ditiobis-2 nitrobenzoico es un reactivo que sólo reacciona con grupos -SH libres, y no con los tiol ésteres, pudiendo leerse la aparición de color a 412 nm. En la determinación, la cubeta muestra y referencia contienen 1 ml de tampón fosfato sódico 0'1 M pH 7'0 y 0'05 ml de DTNB 0'01 M. Posteriormente, a la cubeta muestra, se le añaden 2 ó 3 μ l de CoA 0'010 M alcanzando la absorbancia un valor de 0'5-0'6. Al añadir el acil-CoA a la cubeta referencia, la absorbancia descenderá según su pureza. El valor de la misma se puede calcular como tanto por ciento de la absorbancia obtenida frente a la de la muestra.

III. 2.4.3.3. Cromatografía en capa fina

La cromatografía en capa fina se realiza en cromatofolios de aluminio de silicagel 60 F₂₅₄, con espesor

de capa de 0'2 mm. El método permite apreciar cualitativamente la síntesis del acil-CoA diferenciando los sustratos y otros productos de la reacción, así, al eluir en una misma placa los compuestos empleados en su síntesis y el producto obtenido, la visualización de sus distintas bandas a la luz ultravioleta nos sirve de índice de la pureza del producto. Las fases móviles empleadas para eluir son cloroformo/metanol/acético (5:4:1), cloroformo/etanol (8:2), cloroformo/metanol/acético (3:5:2).

En los ensayos para comprobar la pureza de los acil-CoA, ésta resultó estar comprendida entre el 95 y el 99 por ciento.

III. 2.5. Crecimiento celular

III. 2.5.1. Crecimiento en medio sólido

Generalmente las placas, conteniendo medio sólido, se siembran con un pequeño inóculo de la capa elegida, que se extiende por toda la placa con un asa de platino. En aquellas ocasiones, en que se requiere un crecimiento rápido o conocer el número de células viables se realizan precultivos en medio rico y a partir de este medio se esparcen por la placa. Estas operaciones se realizan en una cámara de flujo laminar en condiciones de esterilidad. Las

placas así preparadas y rotuladas, se incuban en una estufa de cultivos a 37°C, observándose el crecimiento a las 24, 48 y 72 horas; cuando el crecimiento es el adecuado se almacenan a 0°C.

III. 2.5.2. Crecimiento en medio líquido

Normalmente el crecimiento en medio líquido se realiza en matraces de 250 ml, los cuales se esterilizan con 100 ml de medio mínimo. Posteriormente, se suplementan con la fuente de carbono y energía deseada. La siembra se efectúa, en condiciones estériles, inoculando una pequeña cantidad, recogida con el asa de platino, de la cepa conservada en medio sólido. En otras ocasiones, se realiza un precultivo en medio rico del cual se añade una pequeña cantidad al matraz de cultivo.

La incubación se realiza a 37°C aeróbicamente, y con agitación constante de 200 rpm en un agitador orbital Gallekamp.

El crecimiento se sigue, midiendo la absorbancia a 680 nm en un espectrofotómetro Spectronic 20 de Bausch y Lomb frente al medio de cultivo empleado. En estas condiciones, una absorbancia de 1'0 corresponde a 0'68 mg de peso seco de células/ml ó $1'36 \times 10^9$ células.

III. 2.5.2.1. Recogida de células

Las bacterias fueron crecidas, en condiciones anteriormente descritas, hasta alcanzar tres fases distintas de crecimiento: comienzo de la fase logarítmica, segun da mitad de ésta y fase estacionaria. Al alcanzar el creci miento deseado se recogieron por centrifugación a 13.000 x g durante 5 minutos a 4°C y se lavaron dos veces con 50 ml de tampón Tris-HCl 50 mM pH 7'0, manteniéndose a 4°C, o bien congeladas, hasta su utilización.

III. 2.6. Medida del consumo de oxígeno

El consumo de oxígeno, tanto en extractos celula res como en células enteras o permeabilizadas, fue determi nado polarográficamente a 30°C en un aparato Gilson (Gilson Medical Electronics, Middleton, U.S.A.) al que se encuentra aplicado un electrodo de oxígeno Clark y conectado a un registrador con expansor de escala. La cámara de reac ción tenía una capacidad de 1'35 ml siendo la solubilidad del oxígeno a 30°C, 0'25 μ mol/ml. La cantidad total de oxí geno en estas condiciones es de 340 nmol.

La cámara de reacción contenía como tampón Tris-HCl o fosfato potásico, ambos 0'05 M y pH 7'0, inyectándo se mediante una microjeringa 50-100 μ l de células o extrac

to celular concentrados y crecidos en la fuente de carbono adecuada, dejándose durante varios minutos para determinar el consumo basal o respiración endógena. Posteriormente, se inyectaron cantidades variables de los distintos sustratos (acet., prp., gli., etc.), midiéndose los consumos de oxígeno en estas condiciones y refiriéndose los datos siempre al consumo basal.

Los resultados se expresan en forma de Q_{O_2} que corresponde a los μ litros de oxígeno consumidos por hora y mg de proteína ó mg de peso seco celular.

III. 2.7. Técnicas mutagénicas

III. 2.7.1. Selección de mutantes espontáneos timina (-)

Este método está basado en la inhibición del crecimiento de las células timina (+) por acción de trimetoprim (y también de la aminopterina), pero no él de las timina (-), en presencia de altas cantidades de timina; así después de varias generaciones creciendo en timina y trimetoprim los cultivos de E. coli contienen predominantemente células tim⁻. Estos mutantes requieren 50 μ g/ml de timina para crecer, carecen de timidilato sintetasa y mapean aproximadamente en el minuto 55 del genoma de E. coli.

El trimetoprim es un inhibidor de la enzima bacteriana dihidrofolato reductasa (Hitchings, 1969), pero no de la de mamíferos, la cual reduce el ácido dihidrofólico (DHF) a tetrahidrofólico (THF); por ello, en presencia de trimetoprim disminuyen las cantidades de THF y decrece la concentración de metabolitos que derivan de él (Miovic y Pizer, 1971; Amyes y Smith, 1974).

Los tetrahidrofolatos son usados en bacterias para la formación de metionina y glicina, para la síntesis de purinas y para la iniciación de la síntesis de proteína.

El procedimiento seguido para aislar tim⁻ es el descrito por Miller (1972). De un precultivo en medio rico (LB) de S. typhimurium se inoculan 0'2 ml en una placa de M-63 suplementado con glucosa 10 mM, timina 0'05 mg/ml y trimetoprim 1 mg/ml. Todos los componentes se esterilizan excepto el trimetoprim, que no se puede someter a elevadas temperaturas, y fue microfiltrado. Las placas se incuban a 37°C durante 36 horas. Transcurrido este tiempo las simples colonias aparecidas se trasladan separadamente a placas de idéntica composición a las anteriores y se incuban en las mismas condiciones.

Estas colonias se someten a posterior purifica-

ción comprobándose su falta de crecimiento en glucosa y su crecimiento normal en glucosa más timina.

Los mutantes espontáneos así aislados son tim⁻ y se usaron en pasos posteriores.

III. 2.7.2. Aislamiento y selección de mutantes inducidos

III. 2.7.2.1. Inducción de mutantes por EMS

El método seguido para obtener mutantes deficientes en la ruta del propionato por tratamiento con EMS, tanto en medio M-63 como en medio Gorini, fue el mismo, y el procedimiento seguido es el descrito por Miller (1972). Se crece la cepa deseada en medio mínimo suplementado con propionato (fuente de carbono selectiva), bajo condiciones normales ya descritas, hasta que el cultivo alcanza la fase logarítmica (0'4-0'9 de absorbancia a 680 nm). Se recogen, por centrifugación a 13.000 x g durante 10 minutos a 4°C, las células precisas para alcanzar una absorbancia de 0'14 al resuspender en 100 ml de medio mínimo. Se toman 2 ml de esta suspensión y se llevan a un matraz estéril de 30 ml, al cual se le añaden con pipeta de punta desechable 30 μ l de EMS. Este matraz se incuba con agitación lenta (50 rpm) a 37°C durante dos horas.

Transcurrido este periodo de tiempo, se añade al matraz 20 ml de M-63 suplementado con fuente de carbono no selectiva (glicerol ó glucosa) y se deja crecer durante toda la noche (tiempo suficiente para alcanzar un desarrollo visible). Pasado este tiempo, se le añaden otros 80 ml de M-63 con glucosa ó glicerol y se deja crecer hasta alcanzar la fase logarítmica.

Llegado a este punto las células necesarias se recogen por centrifugación a 13.000 x g durante 5 minutos a 4°C y se resuspenden en un matraz que contiene 100 ml de medio mínimo suplementado con propionato hasta una absorbancia de 0'08, dejándose crecer en condiciones normales hasta 0'17, y conservándose posteriormente a 4°C.

III. 2.7.2.2. Inducción de mutantes por 2-AP

Se realizó según la técnica de Miller (1972). En este caso la cepa que se desea mutar se crece en medio mínimo suplementado con propionato hasta fase logarítmica. Alcanzado este nivel de crecimiento se hace de esta suspensión celular una dilución 10 y se toman 0'1 ml de la dilución llevándoles a un matraz de 30 ml que contiene 5 ml de LB y 3 mg de 2-AP.

Este matraz se incuba, bajo condiciones norma-

les, durante varias generaciones hasta alcanzar la fase estacionaria. Posteriormente, se centrifuga a 13.000 x g, durante 10 minutos a 4°C. Las células, así obtenidas, se resuspenden en medio mínimo con fuente selectiva hasta una Ab_{680nm} de 0'08, dejándose crecer hasta 0'17 y conservándose posteriormente a 4°C.

III. 2.7.2.3. Selección de mutantes por tratamiento con penicilina

Una vez efectuada la mutación, por cualquiera de los dos métodos, se procedió a la selección y enriquecimiento en mutantes, según Gorini y Kaufman (1960), por medio de penicilina. Para ello, de la suspensión celular crecida en condiciones selectivas hasta Ab_{680nm} de 0'17, se toman 5 ml y se añaden a un tubo de ensayo estéril y otros 5 ml a otro que contiene 6 mg de penicilina G sódica. Ambos tubos se colocan en una estufa de cultivo a 37°C en posición inclinada y sin agitación hasta que la absorbancia del tubo carente de penicilina alcance 0'5. En ese instante se centrifuga el tubo con penicilina a 40.000 x g durante 20 minutos a 4°C y las células se resuspenden en 10 ml de medio mínimo estéril.

III. 2.7.3. Replicación en placa

A partir de los 10 ml de suspensión celular procedente de los procesos de mutación y selección de penicilina, se hacen sucesivas diluciones, y se toman 0'1 ml de cada una de ellas, extendiéndose sobre distintas placas de Petri, que contienen medio sólido M-63 y glucosa ó glicerol como fuente de carbono. Cuando las colonias son visibles se eligen aquella o aquellas placas correspondientes a determinadas diluciones en que las colonias aparecen separadas unas de otras y con la ayuda de un trozo de tela de terciopelo y un aparato de madera con diámetro ajustable a la placa (Miller, 1972), se traspasan cuidadosamente y de una sola vez a placas con M-63 y propionato como fuente selectiva de carbono y a placas con M-63 y glucosa o glicerol como fuente de carbono. Cuando las colonias son perfectamente visibles (24-30 horas) se comparan las dos placas que se corresponden y se eligen aquellas colonias que han crecido únicamente en el medio no selectivo, purificándose y comprobándose posteriormente su fenotipo.

III. 2.8. Preparación de extractos celulares

Las células procedentes de un matraz de 100 ml, crecidas y recogidas como se ha descrito anteriormente (sección III. 2.5.), se resuspenden en 4 ml de tampón

Tris-HCl 50 mM pH 7.0. Esta suspensión se sonica en un desintegrador ultrasónico (MSE) a 0°C durante 2 minutos con pulsos de 30 segundos, operando en una amplitud de 8 a 9 μ m de pico a pico, centrifugándose posteriormente a 35.000 x g, durante 15 minutos a 4°C, para eliminar los restos celulares. El sobrenadante se recoge y se mantiene a 4°C hasta su utilización.

III. 2.9. Obtención de células permeabilizadas

El método seguido para la obtención de células permeabilizadas ha sido fundamentalmente el descrito por Reeves y Sols (1973), ligeramente modificado.

Las bacterias se crecen aeróbicamente a 37°C en 100 ml de medio M-63 suplementado con la fuente de carbono apropiada. Cuando el crecimiento alcanza la segunda mitad de la fase logarítmica se recogen las células centrifugando a 13.000 x g durante 5 minutos a 4°C. Posteriormente, las células se lavan con 50 ml de tampón fosfato 0.05 M pH 7.0, resuspendiéndose finalmente en 4 ml del mismo tampón. A continuación, a 1 ml de esta suspensión celular (y de diluciones sucesivas de ella), se añaden 10 μ l de solución de tolueno: etanol (1:9 v/v), manteniéndose la temperatura a 0°C. La suspensión se somete a agitación durante 1 minuto en un agitador vibratorio Braun, almacenándose

a 0°C hasta su utilización.

III. 2.10. Tratamiento de choque osmótico

Se ha observado que, cuando algunas Enterobacteriaceas se someten a choques osmóticos de intensidad moderada, se provoca la separación selectiva de enzimas hidrolíticas y de algunas proteínas relacionadas con el transporte al interior celular de varios compuestos de la membrana celular. Aunque del hecho en sí no se tiene evidencia directa, se cree que estas proteínas se encuentran localizadas en compartimentos superficiales entre la pared celular y la membrana plasmática, en vez de encontrarse libres en el citoplasma.

La cantidad de proteína liberada por este procedimiento representa aproximadamente el 3'5% de la proteína celular total. Las células sometidas a choque osmótico permanecen viables, y resuspendidas en un medio de cultivo pueden crecer normalmente después de un periodo de adaptación de 30-40 minutos (Heppel, 1971).

Para proceder al tratamiento por choque osmótico se cultivan en dos matraces de 500 ml con 200 ml de medio mínimo suplementado con propionato y se crecen hasta alcanzar la fase estacionaria. Posteriormente, se centrifugan

a 13.000 x g durante 5 minutos a 4°C y se lavan tres veces con 50 ml de tampón Tris-HCl 0'03 M pH 7'0. Las células correspondientes a uno de los matraces se guardan a 4°C. Esta suspensión se sonica posteriormente, obteniéndose el extracto control no sometido a choque. Las células del otro matraz se resuspenden en 80 partes (v/v) de solución de sacarosa 0'5 M que contiene Tris-HCl 0'033 M pH 7'2 y EDTA 1 mM. La mezcla se agita a temperatura ambiente 10 minutos en un erlenmeyer de 500 ml y posteriormente se centrifuga a 13.000 x g 5 minutos a 4°C. Una vez eliminado el sobrenadante, el precipitado obtenido se resuspende rápidamente en 80 partes de agua destilada a 0°C y se agita vigorosamente 10 minutos a 0°C. A continuación la mezcla se centrifuga y el sobrenadante líquido (que contiene las proteínas liberadas por choque osmótico) se conserva a 0-4°C. El precipitado se resuspende en 8 ml de Tris-HCl 0'033 M pH 7'2, se sonica, obteniéndose el extracto libre de células sometidas a choque, por centrifugación.

A partir de las células control se obtiene también el extracto por sonicación y centrifugación.

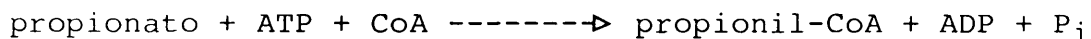
El extracto preparado de las células sometidas a choque, el sobrenadante líquido del choque y el del extracto preparado de las células no sometidas a choque se almacena a 0-4°C para su posterior análisis.

III. 2.11. Técnicas enzimáticas

Los ensayos de actividad de las distintas enzimas estudiadas se llevaron a cabo a 30°C en un espectrofotómetro Beckman modelo 35 ó en un espectrofotómetro UNICAM S.P. 1800, ambos con registrador y control de temperatura incorporados.

III. 2.11.1. Activación del propionato intracelular

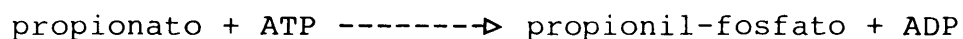
La activación del propionato ha sido descrita como un proceso llevado a cabo en dos etapas catalizadas por enzimas distintas, cuyo resultado global se puede esquematizar así:



La primera de las enzimas cataliza la fosforilación del propionato y la segunda, la formación del acil-CoA.

III. 2.11.1.1. ATP-monocarboxilato fosfotransferasa (EC 2.7.2.1.)

Esta enzima cataliza la primera etapa del proceso de activación:



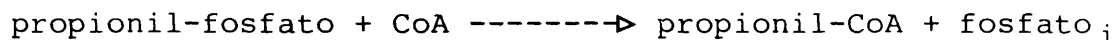
El método seguido para la determinación de su actividad fue el descrito por Hodgson y McGarry (1968b). La solución de ensayo contenía en 10 ml: 0'25 mmol de tampón Tris-HCl pH 7'6, 0'2 mmol de MgCl_2 , 0'2 mmol de ATP, 2'0 mmol de clorhidrato de hidroxilamina pH 7'0 (iguales volúmenes de clorhidrato de hidroxilamina 4'0 M y NaOH 3'5 N), 0'1 mmol de sustrato (propionato ó acetato) y extractos bacterianos crecidos en propionato conteniendo aproximadamente 20 mg de proteína.

La mezcla de reacción fue incubada a 30°C y a intervalos de 60 minutos se tomaron alicuotas de 1 ml y se mezclaron con 3'0 ml de reactivo de FeCl_3 ; posteriormente, la proteína fue sedimentada y los sobrenadantes fueron medidos a 540 nm determinando la concentración de hidroxamatos.

El método de determinación de la concentración de ácido hidroxámico seguido fue esencialmente el descrito por Stadtman (1957a) usando el reactivo de FeCl_3 . Este reactivo está formado por iguales volúmenes de ácido tricloroacético al 12% (p/v), HCl 3 N y $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ al 5% en HCl 0'1 N.

III. 2.11.1.2. Acil-CoA-ortofosfato aciltransferasa

Esta enzima cataliza la segunda etapa del proceso de activación:



El ensayo de su actividad catabólica fue seguido usando el método de la arsenolisis de Stadtman (1955a) para la acetil-CoA-ortofosfato aciltransferasa (EC 2.3.1.8.) y el método de Stadtman (1957a) para determinar la concentración de hidroxamato, según han descrito Hodgson y McGarry (1968b).

La mezcla de reacción contenía en 10 ml: 300 μmol de tampón Tris-HCl pH 8'0, 100 μmol de clorhidrato de cisteína pH 7'0, 100 μmol de sustrato, 2'0 μmol de CoA y extractos bacterianos conteniendo aproximadamente 10 mg de proteína.

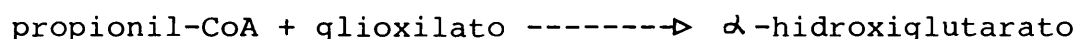
A intervalos de 15 minutos, se toman alícuotas de 1 ml y se mezclan con 50 μmol de arsenato potásico pH 8'0 para provocar la ruptura del posible acil-CoA formado y 15 minutos más tarde se añaden 0'5 ml de clorhidrato de hidroxilamina 2 M determinándose el contenido en hidroxamatos a 540 nm con FeCl_3 , según se ha indicado en el

apartado anterior (III. 2.11.7.1.).

III. 2.11.2. α -hidroxiglutarato sintasa (EC 4.1.3.9.)

La α -hidroxiglutarato sintasa ha sido descrita por primera vez por Reeves y Ajl (1962) en extractos crudos libres de células de E. coli crecida en propionato demostrando que existía una relación equimolar en los descensos de las concentraciones del glioxilato y del propionil-CoA.

La enzima cataliza la condensación entre el glioxilato y el carbono beta del propionil-CoA para dar α -hidroxiglutarato:



El ensayo enzimático seguido para su determinación fue el descrito por Reeves y Ajl (1962) y Reeves y col. (1963). La mezcla de reacción contiene en 1'5 ml: 100 μmol de tampón Tris-HCl pH 8'0, 5 μmol de MgCl_2 , 13'0 μmol de glioxilato sódico, 12'0 μmol de propionil-CoA y 0'5 ml de extractos bacterianos crudos (aproximadamente 2 mg de proteína). En el control, los extractos utilizados fueron previamente hervidos. Los tubos experimental y control fueron incubados a 37°C durante 6 horas anaeróbicamente.

te; pasado este tiempo se detuvo la reacción por adición de tungstato sódico, en H_2SO_4 al 25%, hasta el 7%. La proteína fue eliminada por centrifugación y el sobrenadante fue extraído con éter en un Soxlet durante 36 horas. Posteriormente, el éter fue evaporado y el residuo fue disuelto en una pequeña cantidad de agua; con esta solución se realizó una cromatografía en cromatofolios de celulosa F₂₅₄, empleando como eluyente n-butanol-ácido fórmico-agua (5:2:1).

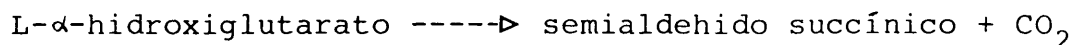
La cromatografía se realizó a temperatura ambiente y el ácido α -hidroxiglutarico se identifica frente a un control de dicho ácido comercial, visualizándose con 0'04% de bromocresol verde en etanol al 95%.

Empleando la misma mezcla de reacción también es posible determinar la transformación enzimática de los sustratos, parando la reacción a tiempos distintos y determinando la concentración de glioxilato y propionil-CoA residuales por los métodos del clorhidrato de fenilhidracina y del DTNB, cuyos fundamentos se describen en las Secciones III. 2.4.3.2. y III. 2.11.5., respectivamente.

III. 2.11.3. α -hidroxiglutarato descarboxilasa

Esta enzima cataliza la descarboxilación oxidativa

va del α -hidroxiglutarato, según el siguiente esquema:

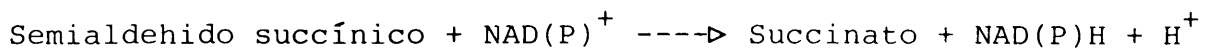


El ensayo para la determinación de su actividad se realizó acoplando esta reacción a la oxidación del semialdehido succínico formado a partir de α -hidroxiglutarato y analizando el incremento de absorbancia a 340 nm debido a la reducción de NAD ó NADP.

La solución de ensayo contenía en 1 ml: 100 μmol de tampón fosfato sódico-potásico pH 8'0, 0'1 μmol de L- α -hidroxiglutarato y 0'14 μmol de NAD ó NADP. La cubeta referencia carecía de NAD ó NADP; la reacción se inició por adición a ambas cubetas de 50 μl de extractos bacterianos ultracentrifugados una hora y media a 120.000 x g. El coeficiente de extinción correspondiente a ambas coenzimas es $6'22 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

III. 2.11.4. Semialdehido succínico deshidrogenasa (EC 1.2.1.16.)

Esta enzima (semialdehido succínico: NAD(P)⁺ oxidoreductasa) cataliza la siguiente reacción:



El método seguido en su determinación ha sido el descrito por Donnelly y Cooper (1981b) que se basa en seguir espectrofotométricamente el incremento de absorbancia a 340 nm, correspondiente a la reducción del NAD ó NADP. La solución de ensayo contenía en 1 ml: 100 μmol de tampón fosfato sódico-potásico pH 8'0, 0'1 μmol de semialdehido succínico y 0'14 μmol de NAD ó NADP. La cubeta muestra carecía de NAD ó NADP; la reacción se comienza por adición a ambas cubetas de 50 μl de extractos bacterianos ultracentrifugados una hora y media a 120.000 x g para eliminar la actividad NADH-oxidasa. El coeficiente de extinción para NADH ó NADPH en estas condiciones es $6'22 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

NAD y NADP fueron ensayados como cofactores por ignorarse si está implicada una deshidrogenasa dependiente de uno u otro coenzima; en el metabolismo de compuestos aromáticos y γ -aminobutirato se han descrito ambos tipos de deshidrogenasa en E. coli cepas B, C y W y únicamente la dependiente de NADP en E. coli K₁₂ (Dover y Halpern, 1972 y 1974; Zaboura y Halpern, 1978; Donnelly y Cooper, 1981a y b).

III. 2.11.5. Isocitrato liasa (EC 4.1.3.1.)

La isocitrato liasa (treo-D_s-Isocitrato glioxilato-liasa) ha sido descrita (Smith y Gunsalus, 1954; Saz, 1954; Olson, 1954; Wong y Ajl, 1955; Saz e Hillary, 1956; Wong y Ajl, 1957, Smith y Gunsalus, 1957; Kornberg y Madsen, 1958; Kornberg y col., 1958; Rosenberg, 1962) como una enzima clave para el metabolismo de compuestos de dos átomos de carbono, en bacterias, a través del ciclo del glioxilato (Ashworth y Kornberg, 1963, 1964; Kornberg, 1963, 1965, 1966a y b).

Esta enzima cataliza la reacción:

Isocitrato -----> Glioxilato + Succinato

El ensayo de actividad de esta enzima se realizó por dos métodos distintos, ambos basados en el incremento de densidad óptica a 324 nm consiguiente con la formación de glioxílico-fenilhidrazona a partir de glioxilato producido.

El primer método seguido fue, esencialmente, el descrito por Dixon y Kornberg (1959) con ligeras modificaciones. La cubeta muestra contiene en un volumen final de 1 ml: 100 μ mol de tampón fosfato potásico pH 6'8, 5 μ mol

de MgCl_2 , 5 μmol de clorhidrato de fenilhidracina, 2 μmol de clorhidrato de cisteina y 4 μmol de D-L-isocitrato. La cubeta blanco no contenía sustrato. La reacción se comenzó con la adición de 50 μl de extractos bacterianos, o una dilución de éstos en ambas cubetas. Después de un periodo de incubación de 1 minuto aproximadamente, el incremento de absorbancia medido a 324 nm, con el tiempo, es lineal. En estas condiciones, el coeficiente de extinción para la glioxílico-fenilhidrazona es $1.7 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

El segundo método empleado fue el de Cooper (Comunicación personal), en el que la cubeta muestra contiene, en 1 ml, 0.64 ml de solución RIM compuesta por cantidades iguales de MgCl_2 0.0125 M y tampón imidazol 0.0625 M pH 6.8, 4 μmol de clorhidrato de fenilhidracina y 2 μmol de D-L-isocitrato. La cubeta referencia carecía de sustrato. La reacción se inició por adición de 50 μl de extractos, o de una dilución adecuada de éstos en ambas cubetas. El coeficiente de extinción en estas condiciones es de $14.2 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

III. 2.11.6. Malato sintasa (EC 4.1.3.2.)

Esta enzima y la anterior completan el ciclo del glioxilato (Wong y Ajl, 1956, 1957; Reeves y Ajl, 1960; Kornberg, 1965 y 1966a y b; Vanderwinkel y De Vlieghere,

1968).

La malato sintasa (L-malato glioxilato-liasa (CoA-acetilante)) cataliza la reacción:



Entre los distintos métodos descritos para la determinación de la actividad de esta enzima (Stadtman, 1956; Ornston y Ornston, 1969; Reeves y Ajl, 1960; Wegener y col., 1968a) se eligió el propuesto por Dixon y Kornberg (1959) por ser el más comunmente utilizado en este tipo de determinaciones. El ensayo se fundamenta en la medida de la velocidad de descenso de densidad óptica a 232 nm consecuente con la rotura del enlace tio-éster del acetil-CoA en presencia de glioxilato. La solución de ensayo contiene en 1 ml: 42 μmol de Tris-HCl pH 7'0, 5 μmol de MgCl_2 , 0'080 μmol de acetil-CoA y 50 μl de extractos bacterianos, o dilución de éstos.

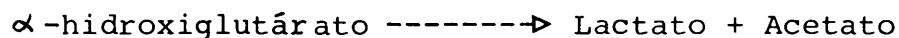
Para detectar la posible presencia de una acetil-CoA desacilasa, la mezcla de reacción se mantiene a 30°C durante varios minutos hasta conseguir que la absorbancia se estabilice, comenzándose entonces la reacción por adición de 2'5 μmol de glioxilato sódico en la cubeta muestra.

El coeficiente de extinción utilizado en la reacción es de $4.5 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

III. 2.11.7. α -hidroxiglutarato liasa

Esta enzima ha sido descrita, por vez primera, en extractos de E. coli crecidos en propionato por Reeves y Ajl (1963). De su acción catalítica resulta la formación de acetato y lactato empleando ácido α -hidroxiglutarico como sustrato.

La reacción catalizada es:



El método seguido para la determinación de la actividad α -hidroxiglutarato liasa ha sido el descrito por los autores anteriormente mencionados. La mezcla de reacción contenía en un volumen final de 2 ml: 100 μmol de tampón Tris-HCl pH 7.5, 65 μmol de α -hidroxiglutarato sódico y 0.5 ml de extractos bacterianos (aproximadamente 8 mg de proteína). Como controles fueron usadas soluciones de igual composición a la anterior en las que fue omitido el sustrato o los extractos fueron hervidos previamente.

Las soluciones control y experimental fueron in-

cubadas dos horas a 30°C en atmósfera de N₂. Posteriormente, fueron añadidos 0'2 ml de HClO₄ al 10% para precipitar la proteína y el pH fue ajustado a 3'0-4'0 con KOH al 30%. Los sobrenadantes obtenidos por centrifugación fueron utilizados para determinar sus contenidos en lactato.

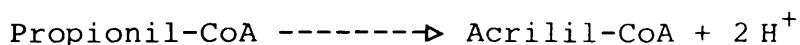
La concentración en ácido láctico fue determinado por el Método de Quastel (1957). El procedimiento seguido consiste en añadir 20, 40, 80 y 160 µl del tubo experimental y 160 µl de cada control a distintos tubos conteniendo, en 0'5 ml: 50 µmol de tampón fosfato pH 7'0, 2'5 mg de TTZ, 4 µmol de NAD, 10 µl de LDH (2 UI) y 1'5 mg de proteína diaforasa.

Los tubos tapados fueron incubados a 30°C durante 12 minutos. Pasado este tiempo se agregaron 2'2 ml de etanol para detener la reacción, disolver el TTZ y precipitar la proteína. Posteriormente, se procedió a centrifugar las muestras y a determinar su absorbancia a 490 nm. Las lecturas obtenidas fueron referidas a una curva patrón de lactato preparado de idéntica manera.

III. 2.11.8. Propionil-CoA deshidrogenasa

La propionil-CoA deshidrogenasa cataliza la oxidación del propionil-CoA para dar acrilil-CoA, según el

esquema siguiente:



Los ensayos de esta actividad deshidrogenasa se realizaron siguiendo distintos procedimientos y utilizaron, en la mayoría de los casos, colorantes como aceptores de electrones.

III. 2.11.8.1. Método de Callely y Lloyd (1964)

Según este método la deshidrogenación del propionil-CoA puede seguirse por el descenso de absorbancia a 600 nm simultáneamente a la reducción del 2,6-diclorofenol-indofenol (DCPIP).

La mezcla de reacción contenía en 1 ml: 10 μmol de tampón Tris-HCl pH 7.0, 0.05 ml de 2,6-diclorofenol-indofenol (0.05%), 0.11 μmol de propionil-CoA y cantidades adecuadas de extractos bacterianos. Los ensayos de reacción se realizaron en presencia y ausencia de sustrato; en el primer caso, los extractos fueron añadidos después de 2-3 minutos de estabilización y en el segundo, en el tiempo 0. El descenso de la absorbancia a 600 nm fue medido a temperatura ambiente frente a un control carente de DCPIP.

III. 2.11.8.2. Método de Callely y Lloyd modificado (1964)

El ensayo enzimático descrito anteriormente fue modificado con objeto de seguir continuamente la velocidad de reacción. En este caso, se utilizó un potente aceptor primario de los electrones, la fenacina metasulfato, que los cede no enzimáticamente al DCPIP (Beinert, 1962).

La mezcla de reacción contenía en 1 ml: 10 μmol de tampón Tris-HCl pH 7'0, 0'05 ml de DCPIP, 0'2 mg de fenacina metasulfato (PMS) recién preparada, extractos bacterianos en cantidades adecuadas y 0'10 μmol de propionil-CoA. El control frente al que se leyó carecía de sustrato y la reacción se comenzó con la adición de los extractos.

El coeficiente de extinción para el DCPIP es de $16'1 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

III. 2.11.8.3. Ensayo enzimático de NAD ó NADP

En este ensayo, los aceptores coloreados de electrones utilizados en los métodos anteriores (DCPIP, azul metileno, PMS, TTZ) fueron sustituidos por NAD ó NADP.

La solución de ensayo contenía en 1 ml: 10 μmol

de tampón fosfato pH 7'0, 0'20 μmol de NAD ó NADP, 0'10 μmol de propionil-CoA y cantidades adecuadas de extractos bacterianos. Para evitar la acción de las NADH-oxidasas, o bien se ultracentrifugaron los extractos o bien se inhibió su acción adicionando 100 μmol de cianuro potásico (KCN) a la mezcla de reacción. La reacción se siguió midiendo la aparición de NADH a 340 nm frente a un blanco carente de propionil-CoA. El coeficiente de extinción empleado fue $6'22 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

III. 2.11.8.4. Ensayos de determinación del producto formado por cromatografía líquido-líquido

La mezcla de reacción contenía en 5 ml: 50 μmol de tampón Tris-HCl ó fosfato potásico pH 7'0, 0'50 μmol de propionil-CoA, 200 μl de extractos bacterianos (correspondientes aproximadamente a 0'8 mg).

A diferentes intervalos de tiempo, se tomaron alícuotas de 0'5 ml, desproteinizándose por los procedimientos anteriormente descritos (Sección III. 2.13.2.2.) y centrifugándose a $13.000 \times g$. El sobrenadante fue ultracentrifugado por membrana de Millipore e inyectándose cantidades alícuotas (20 μl) al cromatógrafo de HPLC. Se prepararon distintos blancos que carecían de propionil-CoA o extractos celulares y que se trataron de la misma manera

que la mezcla de reacción estándar.

III. 2.11.9. Acrilil-CoA hidratasa (EC 4.2.1.54.)

La enzima cataliza la reacción:



El método seguido para el ensayo de su actividad enzimática fue el descrito por Baldwin y Wood (1964). La actividad se determinó espectrofotométricamente con acrilil-CoA como sustrato. La velocidad de formación del lactil-CoA se analizó de manera continua por conversión de este producto en lactato libre en presencia de acetato y CoA transferasa. Posteriormente, el lactato fue oxidado con NAD en presencia de lactato deshidrogenasa de músculo y el sistema diaforasa, empleando como colorante azul de p-nitrotetrazolium (BNT). La reducción del BNT fue seguida a 550 nm.

La solución de ensayo contenía en un volumen de 1 ml: 60 μmol de tampón Tris-HCl pH 8'0, 60 μg de BNT, 4'5 μmol de NAD, 0'3 μmol de acrilil-CoA, 1'5 unidades de LDH de músculo, 3 unidades de diaforasa, 3 unidades de CoA-transferasa y cantidades adecuadas de extractos bacterianos. La solución se preincubó en ausencia de acrilil-

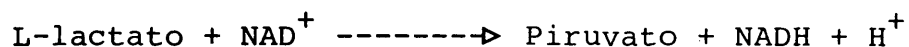
CoA durante varios minutos, hasta que descienda la reducción endógena del colorante. Las lecturas se efectuaron frente a blancos carentes de sustrato, extractos enzimáticos, NAD ó LDH.

En el método de ensayo de actividad las enzimas CoA-transferasa (acetil-CoA:propionato CoA - transferasa, EC 2.8.3.1.) y diaforasa (NADH :(aceptor) oxido-reductasa) pueden ser sustituidas por extractos crudos, calentados 10 minutos a 55°C, de Megasphaera elsdenii. Este organismo contiene estas dos enzimas y también la acrilil-CoA hidrataza, pero esta última es termolábil, destruyéndose con las condiciones de calentamiento anteriormente indicadas (Baldwin y col., 1965).

III. 2.11.10. L(-)Lactato deshidrogenasa (EC 1.1.1.27.)

El ensayo seguido ha sido descrito por Bergmeyer y Bernt (1974).

La L-lactato:NAD-oxidoreductasa cataliza la transformación:



La velocidad de reacción fue seguida midiendo

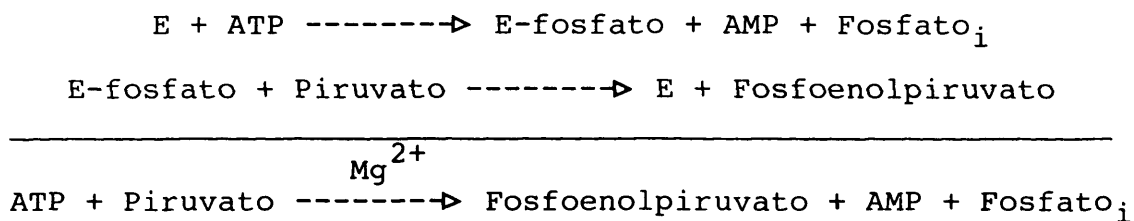
la disminución de la absorbancia a 340 nm asociada con la oxidación del NADH ($\epsilon = 6'22 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

La cubeta de ensayo contenía en 1 ml: 0'20 μmol de NADH, 2 μmol de piruvato sódico y 30 μmol de tampón Tris-HCl pH 7'5. La cubeta blanco no contenía piruvato. La reacción se inició por adición, en ambas cubetas, de 50 μl de extracto enzimático o de una dilución del mismo.

III. 2.11.11. Fosfoenolpiruvato sintetasa (EC 2.7.9.2.)

La fosfoenolpiruvato sintetasa convierte directamente el piruvato en PEP en una reacción, dependiente de ATP, que se distingue por sus productos (PEP, AMP y P_i) de aquella catalizada por la piruvato quinasa (Cooper y Kornberg, 1967 y 1968).

La reacción implica una fosforilación reversible de la enzima y se lleva a cabo, en presencia de Mg^{2+} , según el siguiente esquema:



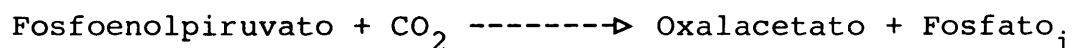
El método seguido para la determinación de la actividad fosfoenolpiruvato sintetasa fue uno de los descritos por Cooper y Kornberg (1968), basado en la medida de la velocidad de transformación dependiente de ATP del piruvato. La determinación de la concentración de piruvato se realizó por el Método de Friedemann y Haugen (1943).

En el ensayo de actividad enzimática la solución de reacción contiene en 1 ml: 100 μmol de tampón Tris-HCl pH 8'4, 10 μmol de MgCl_2 , 10 μmol de ATP pH 6'8, 1'50 μmol de piruvato sódico. El ATP fue omitido del tubo control. Los tubos fueron equilibrados a 30°C y la reacción se inició por adición de 50 μl de extractos bacterianos o una dilución adecuada de éstos. Posteriormente, se tomaron alicuas (0'1 ml) a distintos tiempos de incubación (0, 5, 10 y 15 minutos) y fueron añadidas a tubos de ensayo que contenían 0'9 ml de agua y 0'33 ml de solución de DNPH al 0'1% (en HCl 2 N). Después de 10 minutos a 30°C se añadieron 1'67 ml de NaOH al 10%, midiéndose la absorbancia de todos los tubos pasados 10 minutos a 445 nm frente a un blanco que carece de los 0'1 ml de la solución de reacción. Las lecturas fueron referidas a una curva patrón de piruvato, realizada en idénticas condiciones en la que 6 unidades de absorbancia correponden a 1 μmol de piruvato.

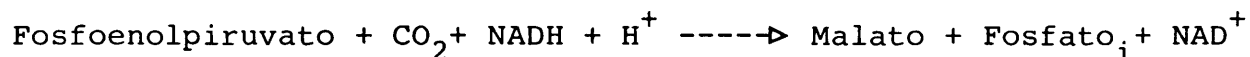
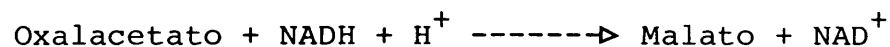
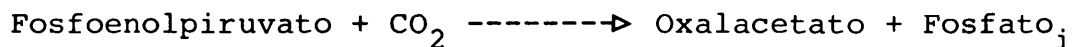
El extracto enzimático para la determinación de la actividad PEP sintetasa se mantuvo a temperatura ambiente dado que la enzima se inactiva a bajas temperaturas.

III. 2.11.12. Fosfoenolpiruvato carboxilasa (EC 4.1.1.31.)

La fosfoenolpiruvato carboxilasa (ortofosfato: oxalacetato carboxi-liasa (fosforilante)) cataliza la carboxilación del PEP resultando la formación de oxalacetato:



La actividad de esta enzima se ensaya por acoplamiento de un sistema en el cual el oxalacetato formado es reducido a malato por el NADH en presencia de malato deshidrogenasa (Cánovas y Kornberg, 1968; Maeba y Sanwal, 1968; Quayle, 1968). La velocidad de oxidación del NADH es medida espectrofotométricamente por el descenso de la absorbancia a 340 nm. En resumen, el sistema de reacción es:



El método de ensayo utilizado fue el descrito

por Maeba y Sanwal (1968) para S. typhimurium LT2. La solución de ensayo contenía en un volumen final de 1 ml: 70 μmol de tampón Tris-HCl pH 9'0, 10 μmol de MgCl_2 , 10 μmol de NaHCO_3 (recién preparado), 4 μmol de PEP sódico y 15 μg de malato deshidrogenasa. La reacción se realizó a 30°C y se inició por adición de 50 μl de extractos bacterianos, o dilución de éstos.

La desaparición del NADH en la cubeta experimental se midió frente a un blanco carente de PEP.

El coeficiente de extinción utilizado fue $6'22 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

III. 2.11.13. Determinación de la formación de piruvato a partir de propionil-CoA

La determinación de formación de piruvato como primer ceto-ácido producido en la degradación del propionil-CoA por extractos de células crecidas en propionato se llevó a cabo según han descrito Hodgson y McGarry (1968b). El método utiliza como reactivo la fenilhidracina, con el mismo fundamento con el que ésta es usada para medir la formación del glioxilato a partir de isocitrato en el ensayo de la isocitrato liasa (Dixon y Kornberg, 1959).

La solución de reacción contenía en 1 ml: 30 μmol de tampón Tris-HCl pH 7'4, 3 μmol de clorhidrato de fenilhidracina y 0'1-0'2 ml de extractos bacterianos (0'5-1'0 mg de proteína). Los distintos ensayos se realizaron añadiendo a esta mezcla cantidades variables de propionil-CoA (0, 0'5, 1, 1'5 μmol) y de NAD^+ (0 ó 2 mg) y midiendo el incremento de absorbancia producido por la formación de piruvato-fenilhidrazona a 324 nm.

III. 2.11.14. Unidades de actividad enzimática

Una unidad internacional corresponde a 1 μmol de producto formado o sustrato transformado por minuto (U).

La actividad específica se expresa en unidades internacionales por mg de proteína (U/mg proteína).

III. 2.12. Determinación de la proteína

El contenido de proteína existente en los diversos extractos enzimáticos utilizados se determinó por medio de la reacción del Biuret o espectrofotométricamente.

En el método del Biuret (Bergmeyer, 1974) las lecturas obtenidas eran referidas a una curva estándar pre

parada con albúmina cristalina de suero bovino.

Espectrofotométricamente se determinó la proteína por el Método de Warburg y Christian, tal como describe Layne (1957), en el cual las lecturas de absorción del extracto a 280 y 260 nm nos permiten calcular la concentración de proteína en él, aplicando la siguiente ecuación:

$$1'55 \times Ab_{280} - 0'76 \times Ab_{260} = (\text{Proteína}) \text{ mg/ml}$$

III. 2.13. Técnicas cromatográficas

III. 2.13.1. Cromatografía en columna

Se realizaron cromatografías de filtración en gel e intercambio iónico según se describe a continuación.

III. 2.13.1.1. Cromatografía de filtración en gel

A los extractos celulares, obtenidos según el apartado III. 2.8., se les agregaron 16 ml de tampón Tris-HCl 0'1 M pH 7'0. A continuación se añadió, lentamente y con agitación, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ sólido finamente pulverizado, a 0°C. La fracción proteica que precipitó entre 0-50% en $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, y que contenía la mayor parte de actividad propionil-CoA deshidrogenasa se redisolvió en 2 ml del tampón

mencionado y se aplicó a una columna (40 x 2'6 cm) de filtración en gel (Sephacryl S 200), previamente equilibrada con tampón Tris-HCl 0'1 M pH 7'0. Las proteínas se eluyeron con el tampón anteriormente indicado manteniendo un flujo constante de 24 ml/h y recogién dose fracciones de 3'0 ml.

III. 2.13.1.2. Cromatografía de intercambio iónico

Los extractos celulares, tratados térmicamente (5 minutos a 50°C), de aproximadamente 0'5 g de peso húmedo en células, fueron aplicados a una columna cromatográfica (12 x 2'5 cm) de intercambio iónico (DEAE Sephacel) previamente equilibrada con tampón Tris-HCl 0'05 M pH 7'0. En estas condiciones la actividad propionil-CoA deshidrogenasa permanecía en la columna. Su elución se realizó por medio de un gradiente continuo de NaCl (0'0-1'0 M) disuelto en 120 ml de tampón Tris-HCl 0'05 M pH 7'0, manteniendo un flujo constante de 12'5 ml/h y recogién dose fracciones de 2'5 ml.

III. 2.13.2. Cromatografía líquido-líquido (HPLC)

Las determinaciones de acrilil-CoA, acetil-CoA, propionil-CoA y CoA-SH se realizaron en un cromatógrafo líquido-líquido compuesto de: una bomba de flujo constante

(Constametric II G, Laboratory Data Control, Riviera Beach, FL, USA), con filtro de 254 nm y fijando las unidades de absorbancia de escala total (AUFS) a 0'02; columna de fase reversa de 10 x 1 cm (μ BONDAPAK C 18) con un tamaño de partícula de 10 μ m, precolumna de acero (10 x 2 mm) rellena de μ BONDAPAK C 18 y manteniendo un flujo de 1 ml/min y una presión del sistema entre 340-350 psi; inyector (Rheodyne) y registrador (Linear) con expansor de escalada incorporado.

La cantidad inyectada en cada elución fue de 20 μ l.

El eluyente se preparó inmediatamente antes de utilizarse mezclando tampón fosfato potásico 0'22 M pH 3'0, metanol y 0'05% de tiodiglicol, ajustando el pH a 4'0, filtrando a través de un filtro Millipore tipo HA (0'45 μ m) y desgasificando con agitación durante 15 minutos.

III. 2.13.2.1. Curvas patrón de CoA y acilos de CoA

Los patrones de CoA y acilos de CoA, preparados según el método ya indicado, fueron utilizados a distintas concentraciones. Analizadas las respuestas con los datos obtenidos al inyectar 20 μ l de estos compuestos y dilucio-

nes de los mismos en el cromatógrafo, se obtuvo una relación lineal entre la cantidad inyectada y la altura del pico producido. El límite de detección fue de 10 picomoles.

III. 2.13.2.2. Preparación de la muestra del ensayo enzimático para HPLC

En la mezcla de reacción del ensayo enzimático se procedió a eliminar la proteína soluble por medio de dos métodos:

- a)- Precipitación con metanol al 20% y posterior filtración a través de filtros Millipore de 0'45 μ m.
- b)- Precipitación en perclórico al 6%, y centrifugación en una centrífuga Eppendorf durante 4 minutos. Posteriormente el pH del sobrenadante se ajusta a 6'0 con KOH. El precipitado de perclorato potásico se separa también por centrifugación y el sobrenadante, filtrado a través de membrana Millipore, se inyecta en el cromatógrafo líquido (Ingebretsen y Farstad, 1980).

III. 2.13.2.3. Obtención de compuestos intermediarios para su análisis por HPLC

El método seguido fue esencialmente el de Bagnara y Finch, modificado por Long (1973). Aproximadamente, 70 mg de células de peso seco se resuspenden en 1'5 ml de HClO_4 1'2 M a 0°C. La suspensión se agita en agitador rotatorio y se mantiene en reposo durante 15 minutos a 0°C, centrifugándose posteriormente a 30.000 x g durante 10 minutos a 4°C. El sobrenadante se neutraliza con una mezcla de KOH 1'08 M y HKCO_3 0'24 M. El precipitado de perclorato potásico se separa por centrifugación a 30.000 x g a 4°C durante 10 minutos y el sobrenadante se filtra a través de un filtro Millipore tipo HA (0'45 μm), desgasificándose a continuación. Posteriormente, se inyectan 20 μl del filtrado en el cromatógrafo líquido-líquido.



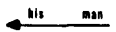

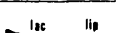
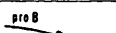


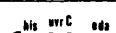



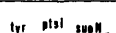



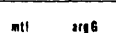





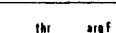
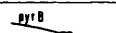




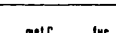
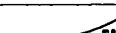
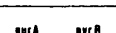
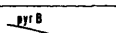
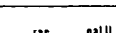
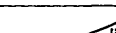
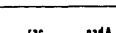
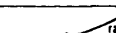

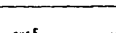
III. 2.14. Experimentos de transferencia episomal

Como prueba previa a la transferencia episomal se realizó un cultivo en placas con medio M-63 y propionato, como fuente de carbono, de los distintos F' de E. coli, sembrándolos en líneas horizontales. Sobre ellas perpendicularmente se siembran los distintos mutantes defectivos en la ruta del propionato que únicamente no eran capaces de crecer en este compuesto y de los que fácilmente

se obtienen revertientes incubándose las placas durante 72 horas a 37°C. Aquellos lugares de intersección entre F' y mutante prp⁻ en los que se observó crecimiento se eligieron para realizar con ellos el experimento de transferencia. En la Tabla II aparecen las distintas cepas F' de E. coli utilizadas.

Una vez seleccionados los mutantes prp⁻ y las cepas F' se intentó la transferencia episomal propiamente dicha, según el procedimiento descrito por Miller (1972). Para ello se cultivan aeróbicamente, y por separado, el mutante y la cepa F' en 2 ml de agar nutriente. Cuando ambos alcanzan la fase logarítmica se incuban juntos (0'5 ml de cada uno) durante una hora a 37°C sin agitación. De este último cultivo se hacen diluciones sucesivas y de cada una de ellas se toman 0'1 ml que se esparcen con un triángulo de vidrio por la superficie de placas de M-63 con propionato. Como controles se usan dos placas idénticas a la anterior en las que se siembran el mutante en una y la cepa F' en la otra. Las placas se incuban a 37°C durante 48 horas.

TABLA II. Colección de cepas F' usadas en el experimento de transferencia episomal.

CEPA	EPISOMA				REFERENCIA
	Nº identificación.	Sentido de la transferencia y marcadores característicos.	Origen de la replicación.	Intervalo de longitud aproximada en minutos.	
F 506/JE 5519	F 506			31-37	Hirota y col. 1977
F 500/GM 5724	F 500			35'5-44'5	G. Novel 1970
ORF 4/KL 251	F 254			6'9-14'2	Berg y Curtiss 1967
F 152/KL 253	F 152			12-16'7	K. B. Low 1972
DFF1/JC 1553	F 150			40'6-44'5	Fraenkel y Banerjee 1974
KLF 43/KL 259	F 143			56-61'5	K. B. Low 1972
KLF 42/KL 253	F 142			50'5-56'2	K. B. Low 1972
KLF 41/JC 1553	F 141			75-66'5	K. B. Low 1972
MAF 1/JC 1553	F 140			81'3-66'5	K. B. Low 1972
KLF 29/JC 1553	F 129			44-51	K. B. Low 1972
E 5014	F 128			5'7-8	E. Singer 1971
KLF 4/AB 2463	F 104			7-98	K. B. Low 1972
KLF 11/JC 1553	F 111			91-81	K. B. Low 1972
KLF 12/JC 1553	F 112			98-88'3	K. B. Low 1972
KLF 16/KL 110	F 116			66-59	K. B. Low 1972
KLF 17/KL 132	F 117			97'5-94'5	K. B. Low 1972
KLF 23/KL 181	F 123			27-32	K. B. Low 1972
KLF 26/KL 181	F 126			16-32	K. B. Low 1972
KLF 33/JC 1553	F 133			88'5-84	K. B. Low 1972

IV. RESULTADOS Y DISCUSION

IV. RESULTADOS Y DISCUSION

IV. 1. Propiedades de crecimiento de Salmonella typhimurium LT2

IV. 1.1. Crecimiento en medio sólido

La capacidad de Salmonella typhimurium (Tabla III), en comparación con la de las cepas K₁₂ (X₂₈₉) y B de E. coli, para utilizar distintos sustratos como única fuente de carbono y energía, se estudió inicialmente. El crecimiento de Salmonella sobre la mayoría de ellos ha sido descrito previamente por Gutnick y col. (1969). El α -hidroxiglutarato se ensaya en el presente trabajo por su posible relación con la ruta catabólica del propionato.

El fenotipo de las tres cepas ensayadas coincide con el descrito en el Manual Bergey (1984). Se puede observar que la utilización de propionato como fuente de carbono es diferente en las dos cepas de E. coli: mientras que en la cepa X₂₈₉ el crecimiento es muy pobre, el crecimiento de la B es relativamente bueno y similar al de Salmonella.

TABLA III. Crecimiento de Salmonella typhimurium LT2 y Escherichia coli cepas B y K₁₂ (X₂₈₉) en medio sólido suplementado con distintas fuentes de carbono y energía.

SUSTRATOS*	<u>E. coli</u> B	<u>E. coli</u> X ₂₈₉	<u>Salmonella</u>
Glucosa	++	++	++
Galactosa	++	++	++
Lactosa	++	++	-
Xilosa	++	++	++
Succinato	++	++	++
Citrato	-	-	++
Glicolato	++	++	++
α-hidroxiglutarato			-
Glioxalato	++	++	-
Laurato			++
Glicerol	++	++	++
Piruvato	++	++	++
Lactato	++	++	++
Propionato	++	+	++
Acetato	++	++	++
p-hidroxifenilacético	++	-	-
γ-aminobutírico + succinato	++	-	-

*Las fuentes de carbono fueron añadidas a concentración estándar "60 C". Las condiciones fueron descritas en la sección III. 2.5.1.

El signo negativo corresponde a no crecimiento; los positivos, crecimiento a las 24 horas (++) y a las 72 horas (+); la ausencia de signo a comprobación no realizada.

La ausencia de crecimiento en α -hidroxiglutarato (según algunos autores posiblemente implicado en la ruta del propionato (Reeves y Ajl, 1960; Reeves y col., 1963; Megraw y col., 1965a y b; Kay, 1972; Richards y Lloyd, 1966; Rabin y col., 1965; Wegener, Reeves y Ajl, 1968a y b; Wegener y col., 1968b)) pudiera ser debido a la no implicación de este compuesto en la ruta degradativa ó a la ausencia de un sistema de transporte a través de membrana para el mismo.

IV. 1.2. Crecimiento de Salmonella typhimurium LT2 en medio líquido

Para establecer las condiciones de cultivo más favorables, que posteriormente fueron utilizadas en nuestro trabajo de investigación, se realizaron pruebas de crecimiento en medio líquido empleando como fuente de carbono propionato 20 mM y como medios mínimos M-63 y el descrito por Reeves y Ajl. Asimismo, se utilizaron medios suplementados con distintos caldos nutritivos completos (NB, LB, Y) en cantidades adecuadas para que únicamente favorezcan el inicio del crecimiento.

IV. 1.2.1. Crecimiento en medios mínimos

Los resultados de crecimiento en medios mínimos

aparecen en las Figuras 3 y 4, en las que se puede apreciar que la velocidad de crecimiento cuando el medio empleado es el M-63 es mucho más lenta que en el medio de Reeves y Ajl.

En la Figura 3 se observa que cuando el propionato sirve como fuente de carbono en medio M-63, la cepa B de E. coli y S. typhimurium crecen relativamente bien, aunque precisan un largo periodo de adaptación (18-20 horas) hasta alcanzar el comienzo de la fase logarítmica; sin embargo, E. coli K₁₂ cepa X₂₈₉, como se había observado en medio sólido, utiliza dicho sustrato lentamente.

En la Figura 4 se observa que la velocidad de crecimiento sobre propionato en medio de Reeves y Ajl es muy rápida, e incluso cepas que no crecen apenas sobre propionato (X₂₈₉) alcanzan niveles altos de crecimiento en relativamente poco tiempo. Esto puede ser debido al alto porcentaje de extracto de levadura (Y) que lleva en su composición el medio de crecimiento suficiente para no considerarle medio mínimo, contrariamente a lo que indican estos autores. Por ello se realizó una comprobación de crecimiento de S. typhimurium en medio de Reeves y Ajl, pero sin suplementar con fuente de carbono. En la Figura 5 se puede observar que en estas condiciones, el crecimiento llega a alcanzar una absorbancia a 680 nm de 0'6-0'8, lo

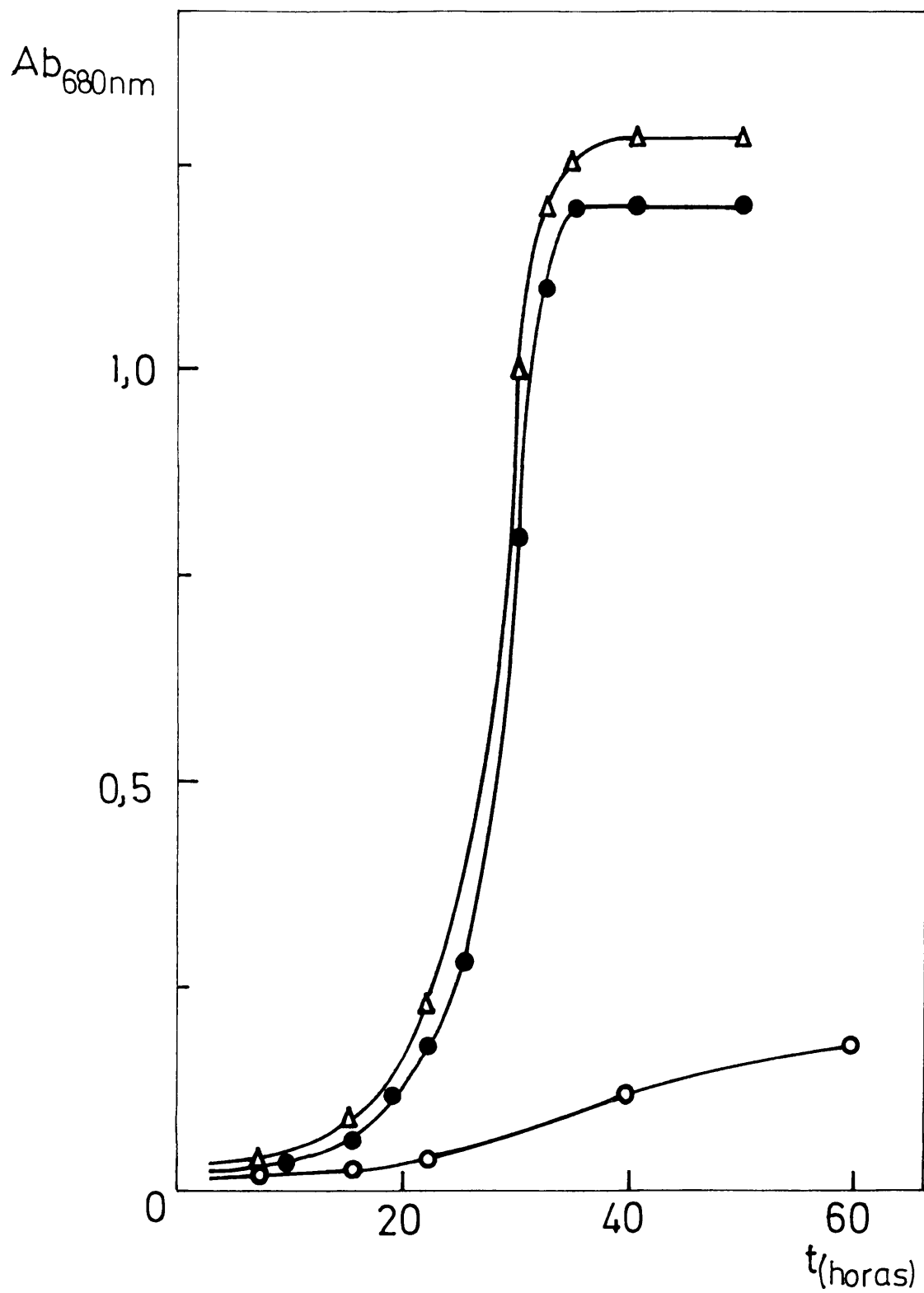


FIGURA 3. Crecimiento de *Salmonella typhimurium* LT2 (-●-), *Escherichia coli* cepa B (-Δ-) y cepa K₁₂ X₂₈₉ (-○-) en medio M-63 suplementado con propionato (20 mM).

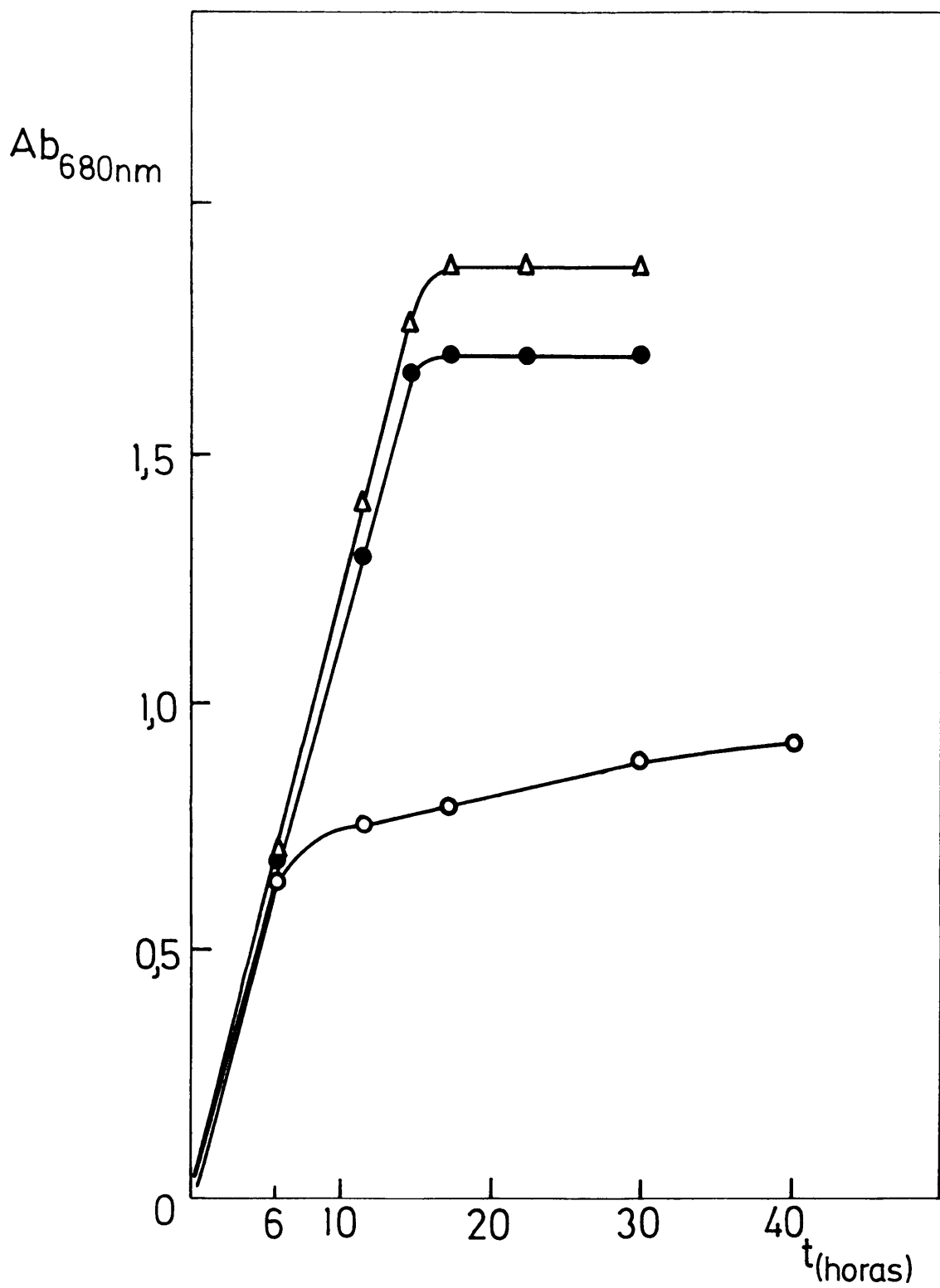


FIGURA 4. Crecimiento de *Salmonella typhimurium* LT2 (- ● -), *Escherichia coli* cepa B (- Δ -) y cepa K₁₂ X₂₈₉ (- ○ -) en medio de Reeves y Aji suplementado con propionato (20 mM).

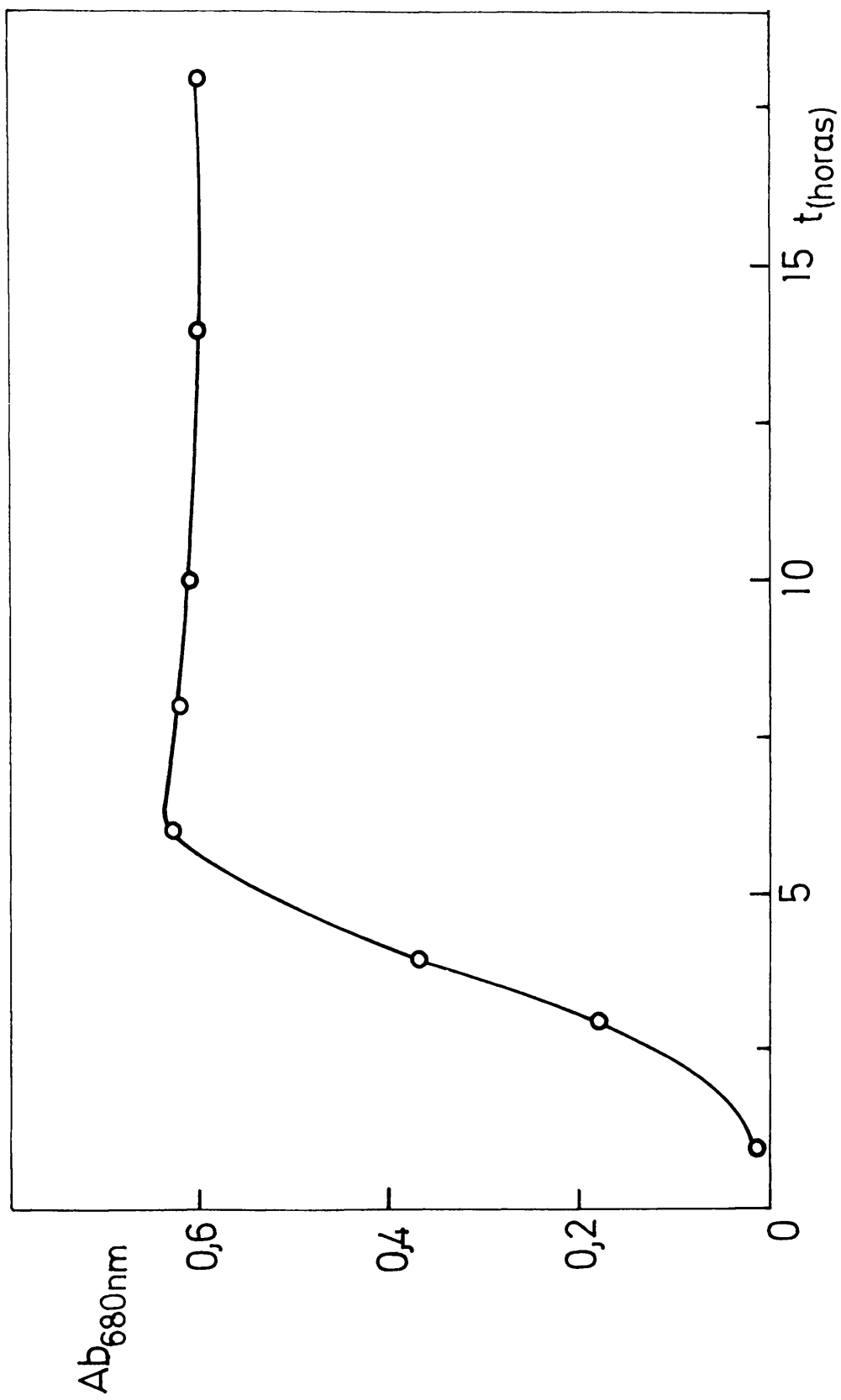


FIGURA 5. Crecimiento de *Salmonella typhimurium* LT2 en medio de Reeves y Ajl.

que puede indicar que, dada la disponibilidad de los nutrientes en el medio de cultivo, las células utilizarán preferentemente los extractos de levadura. Por lo tanto, este medio fue deshechado.

IV. 1.2.2. Crecimiento sobre medio M-63 suplementado con distintos caldos nutritivos

Con objeto de disminuir la excesiva duración del periodo de adaptación o "lag" (tiempo requerido para obtener un incremento de $Ab_{680\text{ nm}}$ de 0-1 a 10 unidades Klett (12'5 unidades Klett se corresponden con un incremento de densidad óptica a 680 nm de 0'1), Kolodziej y col. (1968)) y una vez adoptado como medio mínimo el M-63 se procedió a elegir un suplemento de caldo nutritivo que favoreciera el inicio del crecimiento. En todos los ensayos, se comprobó que las cantidades añadidas servían para alcanzar, como máximo, una absorbancia a 680 nm de 0'08-0'1.

Los suplementos utilizados fueron los medios completos LB, NB ó Y al 1'5%, añadiéndose 1 ml de esta solución a matraces de 100 ml de M-63 y propionato 20 mM.

Las cepas ensayadas fueron S. typhimurium LT2 y E. coli cepas B y K₁₂ (X₂₈₉).

Los resultados correspondientes se muestran en las Figuras 6, 7 y 8. En ellas se puede apreciar fácilmente que en todos los casos ensayados el periodo de adaptación es más corto en presencia de Y. A partir de entonces se ha utilizado Y como suplemento en los posteriores ensayos de crecimiento de Salmonella sobre propionato, a una concentración final de 0'015%; esta solución únicamente permite que el crecimiento alcance el inicio de la fase logarítmica, acortando el "lag" de 18-20 horas a solamente 3 horas (Figura 9).

IV. 1.3. Propiedades de crecimiento de S. typhimurium LT2 en distintas fuentes de carbono: cálculo de los tiempos de generación

Aunque se había ensayado el crecimiento en medio sólido suplementado con distintas fuentes de carbono, este método sólo permite apreciar la presencia o ausencia de crecimiento después de un periodo de tiempo relativamente largo. Sin embargo, el crecimiento de una población microbiana en medio líquido, puede ser considerado como un proceso que bajo condiciones determinadas se realiza a una velocidad exponencial de características definidas y medibles. Por lo tanto, durante el crecimiento exponencial (seguido a intervalos pequeños de tiempo) el tiempo de generación (t) es considerado una magnitud constante.

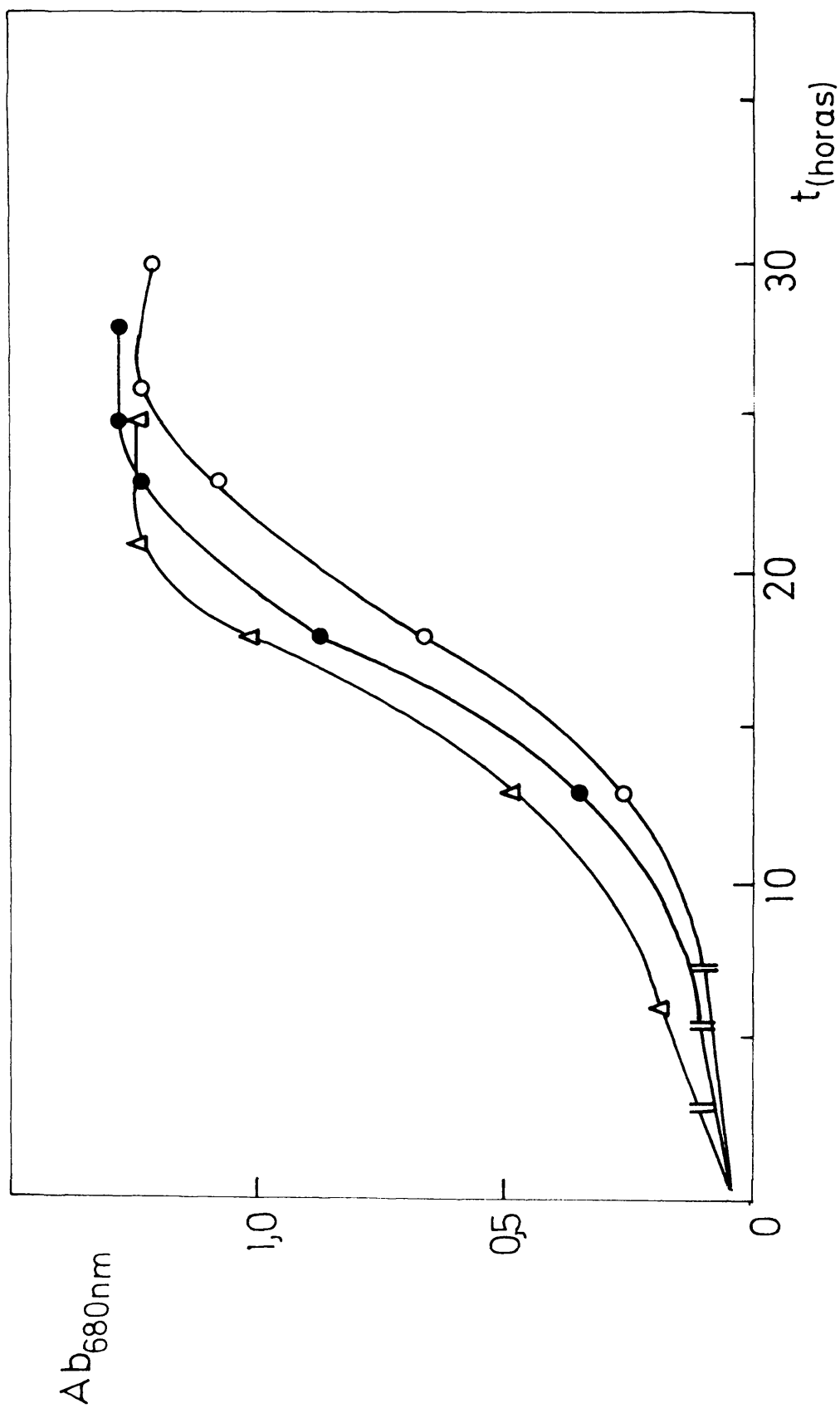


FIGURA 6. Crecimiento de Salmonella typhimurium LT2 en medio M-63, suplementado con propionato (20 mM) y 0.015% de LB (-○-), NB (-●-) y Y (-Δ-).

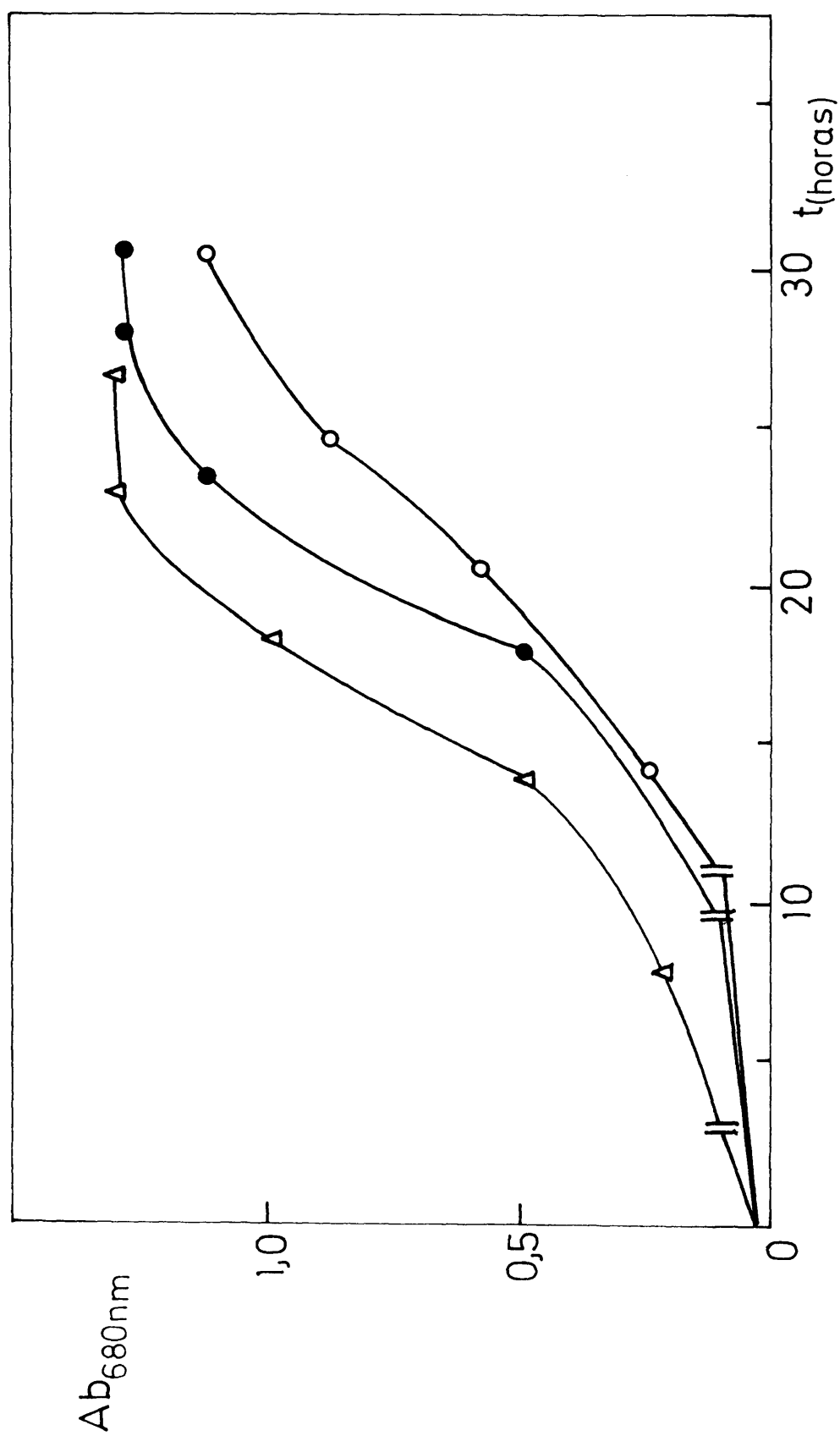


FIGURA 7. Crecimiento de *Escherichia coli* cepa B en medio M-63, suplementado con propionato (20 mM) y 0.015% de LB (○-○-), NB (●-●-), ó Y (△-△-).

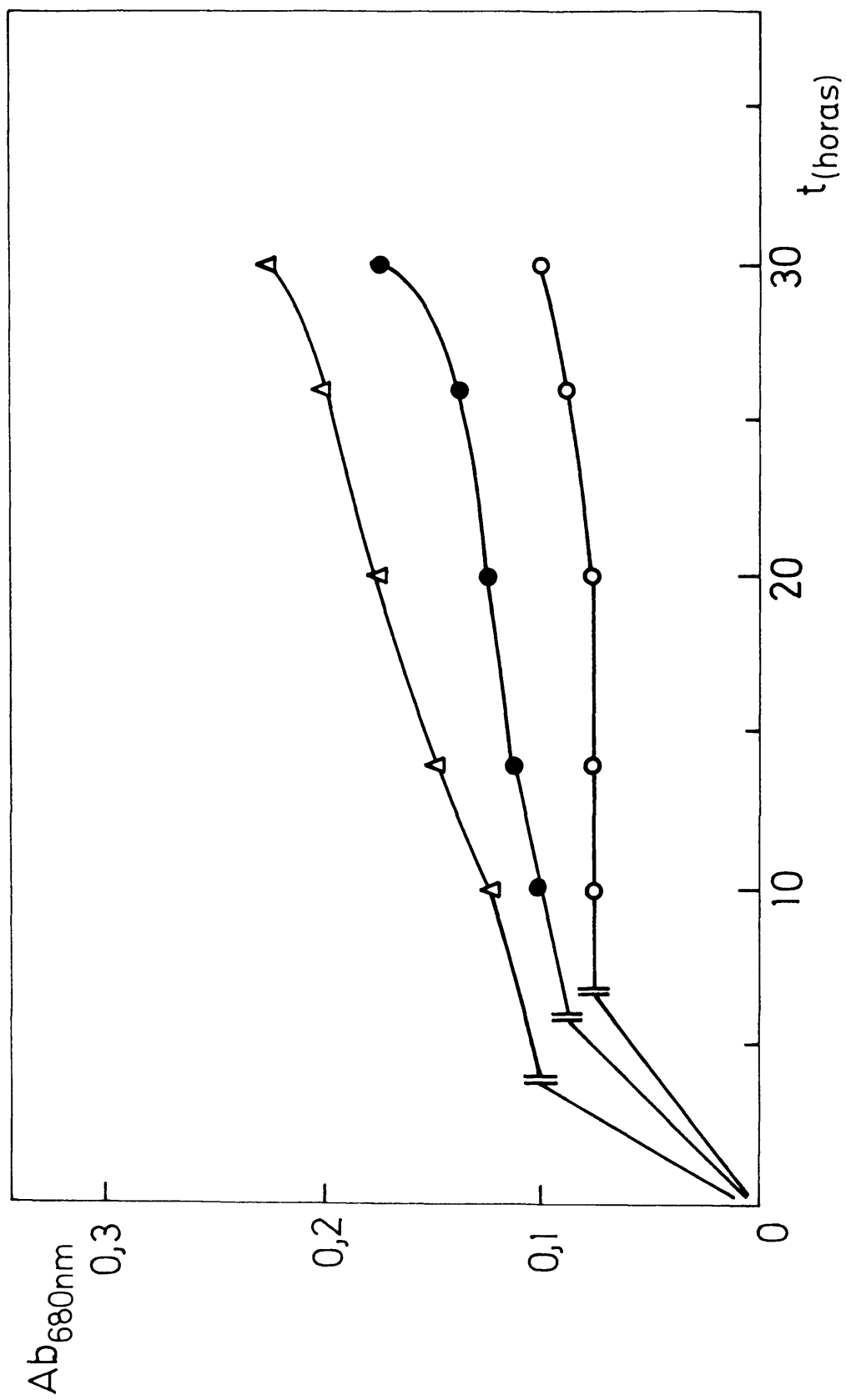


FIGURA 8. Crecimiento de Escherichia coli cepa $K_{12} X_{289}$ en medio M-63, suplementado con propionato (20 mM) y 0'015% de LB ($-\bullet-$), NB ($-\circ-$) ó Y ($-\Delta-$).

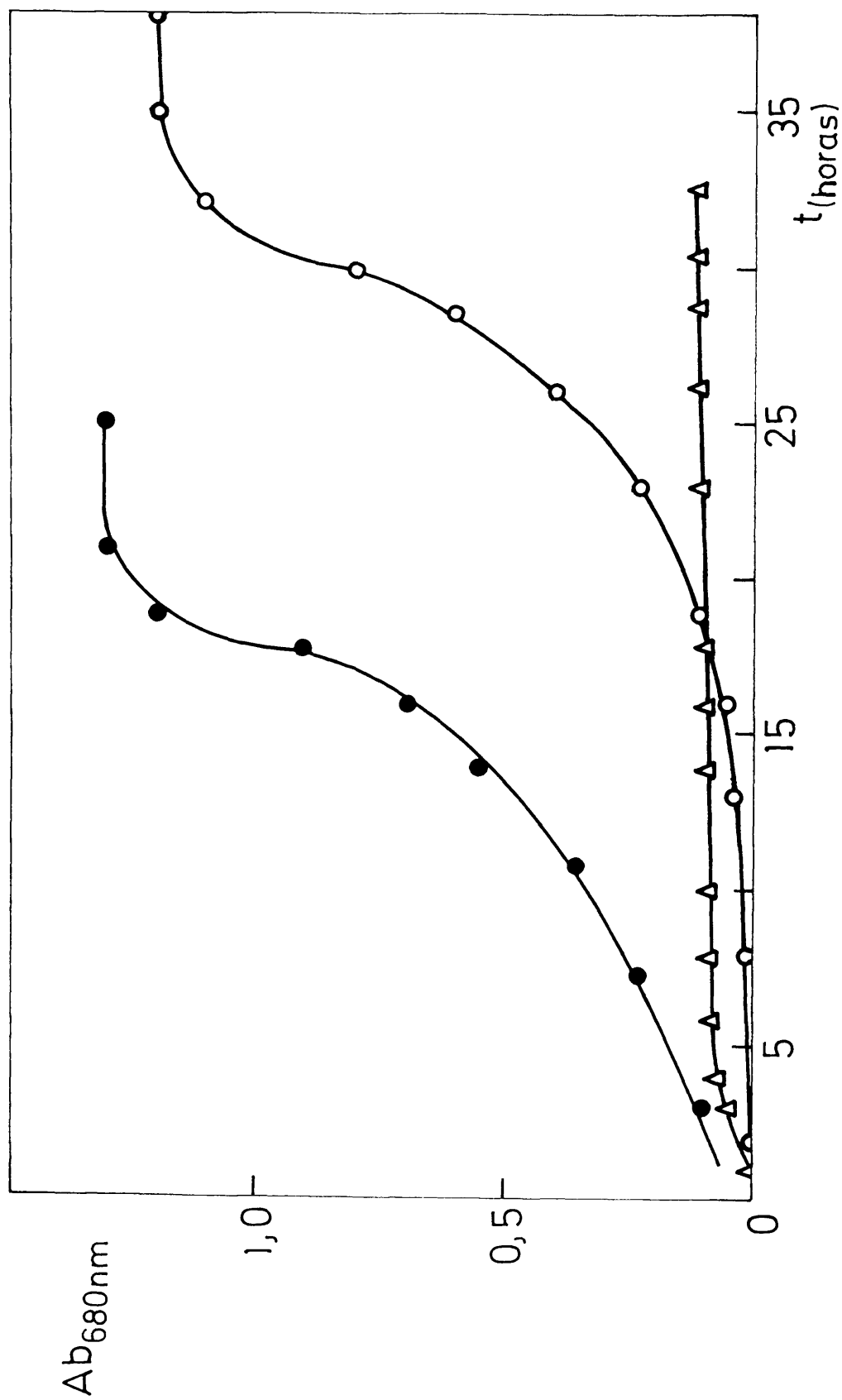


FIGURA 9. Crecimiento de Salmonella typhimurium LT2 en medio M-63, suplementado con: propionato 20 mM (○-○-), Y 0'015% (△-△-) ó propionato 20 mM + Y 0'015% (●-●-).

En la Tabla IV se muestran los tiempos de generación del crecimiento en medio líquido utilizando como fuentes de carbono distintos sustratos en concentración estándar "60 C". Cantidades alicuotas de un cultivo de S. typhimurium LT2 en medio rico se resuspendieron hasta una absorbancia a 680 nm de 0'1, en matraces conteniendo 100 ml de M-63 y el sustrato deseado; se incubaron en condiciones estándar, siguiéndose el crecimiento cada 2 horas. La representación en escala semilogarítmica de la Ab_{680nm} en función del tiempo, nos permitió calcular t en cada caso.

Como se puede observar en dicha Tabla, los compuestos de 3 átomos de carbono son utilizados a distintas velocidades por S. typhimurium, siendo los tiempos de generación para piruvato y lactato mucho menores que el encontrado para el propionato. Este hecho, sin duda, es debido a que en el caso de los dos primeros las enzimas implicadas en su metabolismo pertenecen a la ruta de Embden-Meyerhoff y son constitutivas, mientras para el propionato es preciso inducir las enzimas de su degradación. Por otra parte, aunque estos compuestos poseen una energía potencialmente equivalente, la ruta empleada para el propionato pudiera proporcionar netamente niveles menores de energía por implicar pasos de activación del compuesto en que ésta se consume.

TABLA IV. Tiempos de generación de Salmonella typhimurium LT2 en medio de cultivo líquido con diferentes fuentes de Carbono y Energía

FUENTE DE CARBONO	TIEMPO DE GENERACION
Glucosa	1 h. 30'
Galactosa	1 h. 40'
Glicerol	2 h. 10'
Succinato	2 h. 45'
Lactato	2 h. 40'
Piruvato	2 h. 40'
Acetato	3 h. 10'
Propionato	4 h. 30'

Es interesante destacar que el tiempo de generación correspondiente al propionato es 1 hora y 20 minutos mayor que el del acetato. Smith y Kornberg (1967) describen tiempos de generación muy similares para estos compuestos de Micrococcus denitrificans. Asimismo Wegener y col. (1968b) en E. coli E-26 y Kay (1972) en mutantes prp⁺ de E. coli K₁₂ cepas K_I y K_{II} encuentran valores similares en dichos tiempos de generación. Estos investigadores, basados en estudios metabólicos, han propuesto una interrelación entre las rutas degradativas de propionato y de acetato en estas especies microbianas, hipótesis que no parece ser válida en S. typhimurium dada la diferencia encontrada en la velocidad de crecimiento sobre ambos compuestos.

IV. 2. Estudio de la incorporación de CO₂ en el crecimiento sobre propionato

En algunos organismos se ha comprobado que la adaptación y el crecimiento en propionato parecen estar regulados por la velocidad de formación de ácidos C₄ a partir del propionato (Wegener, Reeves y Ajl, 1968a). Existen dos posibles vías por las que el succinato puede formarse directamente a partir del propionato; una de ellas implica la ruta del α -hidroxiglutarato, la otra implica reacciones de carboxilación. Según ésta última, el succinato puede

formarse por carboxilación de propionil-CoA o por carboxilación de algún metabolito derivado del propionato, tal como el piruvato o el fosfoenolpiruvato.

Como se ha indicado, la ruta que tiene como enzima cabecera a la propionil-CoA carboxilasa es la prioritaria para el metabolismo del propionato en organismos superiores y en algunos microorganismos. La carboxilación del propionil-CoA es dependiente de biotina, y la posterior isomerización de metil-malonil-CoA a succinil-CoA requiere como coenzima vitamina B₁₂. Estos aspectos han sido extensivamente estudiados por Kaziro y Ochoa (1964) en organismos eucariotas y por Wegener y col. (1968b) en procariotas.

Para conocer la importancia que esta ruta de carboxilación tenía en el catabolismo del propionato en S. typhimurium LT2 se analizaron por una parte la duración del "lag" y por otra el tiempo de generación t, ambos en presencia y ausencia de vitamina B₁₂ y/o NaHCO₃ a distintas concentraciones de sustrato.

IV. 2.1. Efecto de la ruta de carboxilación sobre el tiempo de adaptación ("lag") del crecimiento en propionato

Se realizaron precultivos de LT2 en medio comple

to (LB). Alicuotas (aproximadamente de 0'2 ml) de este cultivo se añadieron a matraces que contenían medio M-63 y 20 mM ó 5 mM de propionato; estos matraces fueron suplementados con vitamina B₁₂ (0'5 mg/ml) y/o NaHCO₃ (5 mM).

Los resultados aparecen en la Tabla V, donde, para altas concentraciones de propionato (20 mM), no se observa una reducción apreciable del "lag" que se mantiene entre 18-19 horas cuando en el medio de cultivo están presentes los cofactores. Estos datos no concuerdan con los obtenidos por Kolodziej y col. (1968) en E. coli E-26, en los que tanto la vitamina B₁₂ como el NaHCO₃ reducen sensiblemente el tiempo de adaptación, resultando, incluso, el efecto de ambos aditivo. Por ello, en Salmonella no se puede afirmar que la ruta de carboxilación es operativa en el proceso de adaptación, tal como se propone para E. coli E-26.

Por otra parte, en E. coli W, y en mutantes de esta cepa deficientes en isocitrato liasa (Wegener y col., 1968b), se ha encontrado que la concentración de sustrato en el medio de cultivo influye de forma decisiva sobre la ruta por la cual dicho compuesto es metabolizado. Wegener y col. proponen que a altas concentraciones de propionato (20 mM), éste es oxidado a acetato, siendo en estas condiciones significativamente importante el ciclo del ácido

TABLA V. Efecto del HCO_3^- y/o vitamina B_{12} en la adaptación al crecimiento sobre propionato de Salmonella typhimurium LT2.

Compuestos adicionados al medio	Duración del lag (horas)*	
	Propionato 5 mM	Propionato 20 mM
Ninguno	19	18
Vitamina B_{12}	21	18
NaHCO_3	20	19
Vit. B_{12} + NaHCO_3	19	19

Salmonella fue crecida en medio M-63 con propionato en las concentraciones indicadas y suplementado con 0'5 $\mu\text{g/ml}$ de B_{12} y 5 mM de NaHCO_3 . El lag fue considerado como el tiempo requerido para obtener un incremento de absorbancia de 680 nm de 0-1 a 10 unidades Klett.

*Las cifras expresadas son la media aritmética de tres determinaciones.

glioxílico, y a bajas concentraciones (5 mM) la ruta procede via carboxilación a succinato.

Como se puede observar (Tabla V) en Salmonella, a concentración 5 mM, los "lag" no presentan una variación significativa en ausencia o presencia de B_{12} y/o $NaHCO_3$, manteniéndose como en el caso anterior en 19-20 horas.

IV. 2.2. Efecto de la ruta de carboxilación en el tiempo de generación t

El crecimiento de S. typhimurium en medio líquido fue seguido calculándose los tiempos de generación cuando la bacteria utiliza propionato 20 mM y 5 mM, suplementado con B_{12} y/o $KHCO_3$ en cantidades anteriormente descritas (Figuras 10 y 11).

En la Tabla VI se puede apreciar que el tiempo de generación del crecimiento en propionato 20 mM un valor de $t \approx 4$ horas 30 minutos, es similar al tiempo de generación cuando este compuesto se suplementa con B_{12} y/o $KHCO_3$.

Asimismo en la Figura 11, se observan que para propionato 5 mM el valor de $t \approx 4$ horas 30 minutos es practicamente igual que cuando la concentración es de 20 mM

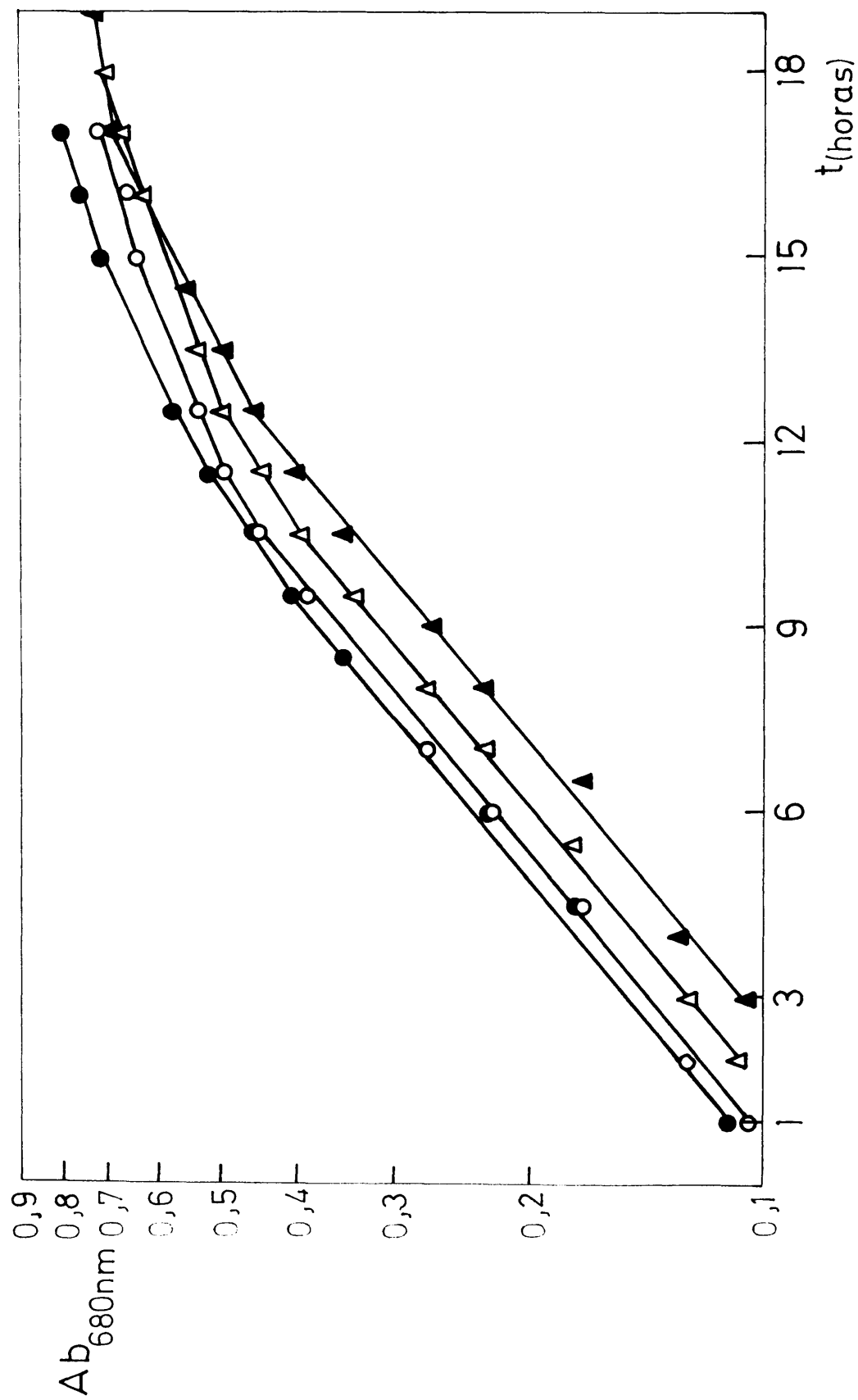


FIGURA 10. Representación semilogarítmica del crecimiento de *Salmonella typhimurium* LT2 sobre: propionato 20 mM (—▲—), propionato 20 mM + vit. B₁₂ 0.5 mg/ml (—●—), propionato 20 mM + NaHCO₃ 5 mM (—○—) ó propionato 20 mM + vit. B₁₂ 0.5 mg/ml + NaHCO₃ 5 mM (—△—).

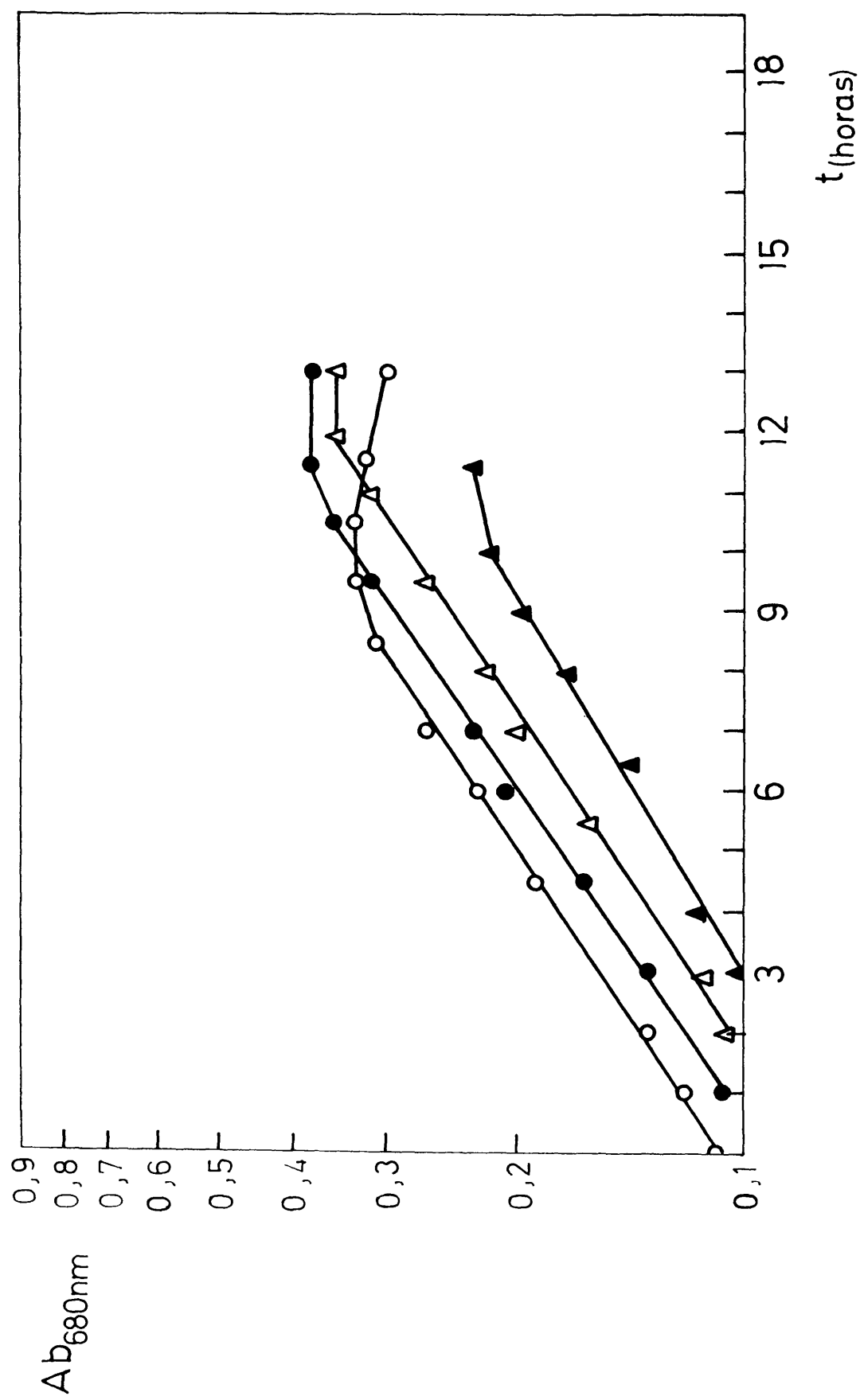


FIGURA 11. Representación semilogarítmica del crecimiento de Salmonella typhimurium LT2 sobre: propionato 5 mM (○—), propionato 5 mM + vit. B₁₂ 0'5 mg/ml (●—), propionato 5 mM + NaHCO₃ 5 mM (△—) ó propionato 5 mM + vit. B₁₂ 0'5 mg/ml + NaHCO₃ 5 mM (—△—).

TABLA VI. Efecto del HCO_3^- y/o vitamina B_{12} en el tiempo de generación sobre propionato de Salmonella typhimurium LT2.

Compuestos adicionados al medio	Tiempo de generación*	
	Propionato 5 mM	Propionato 20 mM
Ninguno	5 h. 45'	4 h. 30'
Vitamina B_{12}	5 h. 30'	4 h. 30'
NaHCO_3	6 h. 00'	4 h. 30'
Vit. B_{12} + NaHCO_3	5 h. 30'	4 h. 30'

Células de Salmonella typhimurium LT2 fueron crecidas en propionato durante¹ toda la noche, resuspendidas, previa centrifugación, para alcanzar una absorbancia de 0'1 en cada matraz que contiene propionato 20 mM ó 5 mM, B_{12} (0'5 mg/ml) y/o HCO_3^- (5 mM).

*Las cifras expresadas son la media aritmética de tres determinaciones.

(Figura 10), pero en este caso debido a la baja concentración de sustrato empleada el crecimiento finaliza mucho antes.

En consecuencia, no se ha encontrado en Salmonella que la cianocobalamina ejerza ninguna acción sobre el crecimiento celular, sin embargo en Ochromonas malhamensis protozoo flagelado, esta vitamina afecta ligeramente el crecimiento en glucosa, formiato y acetato y eleva 100 veces el crecimiento en propionato. En el primer caso, se ha deducido que la vitamina B₁₂ está implicada en reacciones de biosíntesis de proteínas, a nivel de síntesis de valina, fenilalanina y tirosina (Arnstein y White, 1959, 1961b) y en el segundo se ha demostrado la utilización en la ruta de carboxilación para el metabolismo del propionato (Arnstein y White, 1961a y 1962). Similares datos se encuentran en Propionibacterium shermanii, el cual precisa B₁ y B₁₂ para la oxidación del propionato (Stadtman y col., 1960). Esta ruta de carboxilación también parece que es operativa para Rhizobium meliloti (DeHertogh y col., 1964a y b) y Rhodospirillum rubrum (Knight, 1962).

El comportamiento de Salmonella también es diferente del de Micrococcus denitrificans (Smith y Kornberg, 1967), donde se ha comprobado el efecto de carboxilación que produce el NaHCO₃ marcado radioactivamente en el creci

miento sobre propionato, deduciéndose que la ruta empleada era la del metil-malonil-CoA o de carboxilación a succinato.

De los resultados obtenidos en Salmonella typhimurium LT2, se puede deducir que la ruta de carboxilación no resulta operativa, ya que no se apreció efecto en la adición de vitamina B₁₂ y/o NaHCO₃, ni durante las etapas iniciales de crecimiento, ni en el crecimiento a bajas concentraciones de sustrato. Una actuación semejante a Salmonella por lo que respecta a la vitamina B₁₂ y la ruta de carboxilación ha sido descrita en Prototheca zopfii por Callely y Lloyd (1964) y Lloyd (1966).

IV. 3. Efecto de precultivos (acetato, propionato) sobre el crecimiento en propionato

Salmonella typhimurium LT2 fue crecida sobre acetato, propionato y acetato + propionato. Cada uno de estos precultivos, al alcanzar el crecimiento la fase logarítmica, se recogieron y resuspendieron en tres medios que contenían acetato 30 mM, propionato 20 mM, acetato 15 mM + propionato 10 mM, siguiendo el crecimiento a cortos intervalos de tiempo. Los resultados se muestran en las Figuras 12, 13 y 14.

El crecimiento en propionato procedente del precultivo en propionato aparece, tal y como podría esperarse, inmediatamente y con un tiempo de generación de 5 horas. En el crecimiento en acetato alcanza un t normal, 3 horas 55 minutos, después de un corto periodo de adaptación. El perfil de la curva de crecimiento sobre acetato + propionato muestra claramente dos fases precedidas por dos cortos periodos de adaptación que sugiere, según los tiempos de generación (4'05 y 5 horas), que las células utilizan preferentemente acetato, a pesar de tener inducidas las enzimas implicadas en el catabolismo de propionato, y que cuando la concentración de este sustrato se reduce, nuevamente utilizan el propionato (Figura 12).

En el caso del crecimiento sobre acetato, propionato y acetato + propionato, procedentes de acetato + propionato, la ausencia de periodo de adaptación sugiere que tanto las enzimas del catabolismo de acetato como de propionato se encuentran inducidas (Figura 13).

El crecimiento sobre el propionato (procedente de acetato) aparece después de un prolongado tiempo de adaptación (Figura 14) y con un tiempo t significativamente mayor que el crecimiento sobre acetato.

En las tres gráficas se puede observar que hay

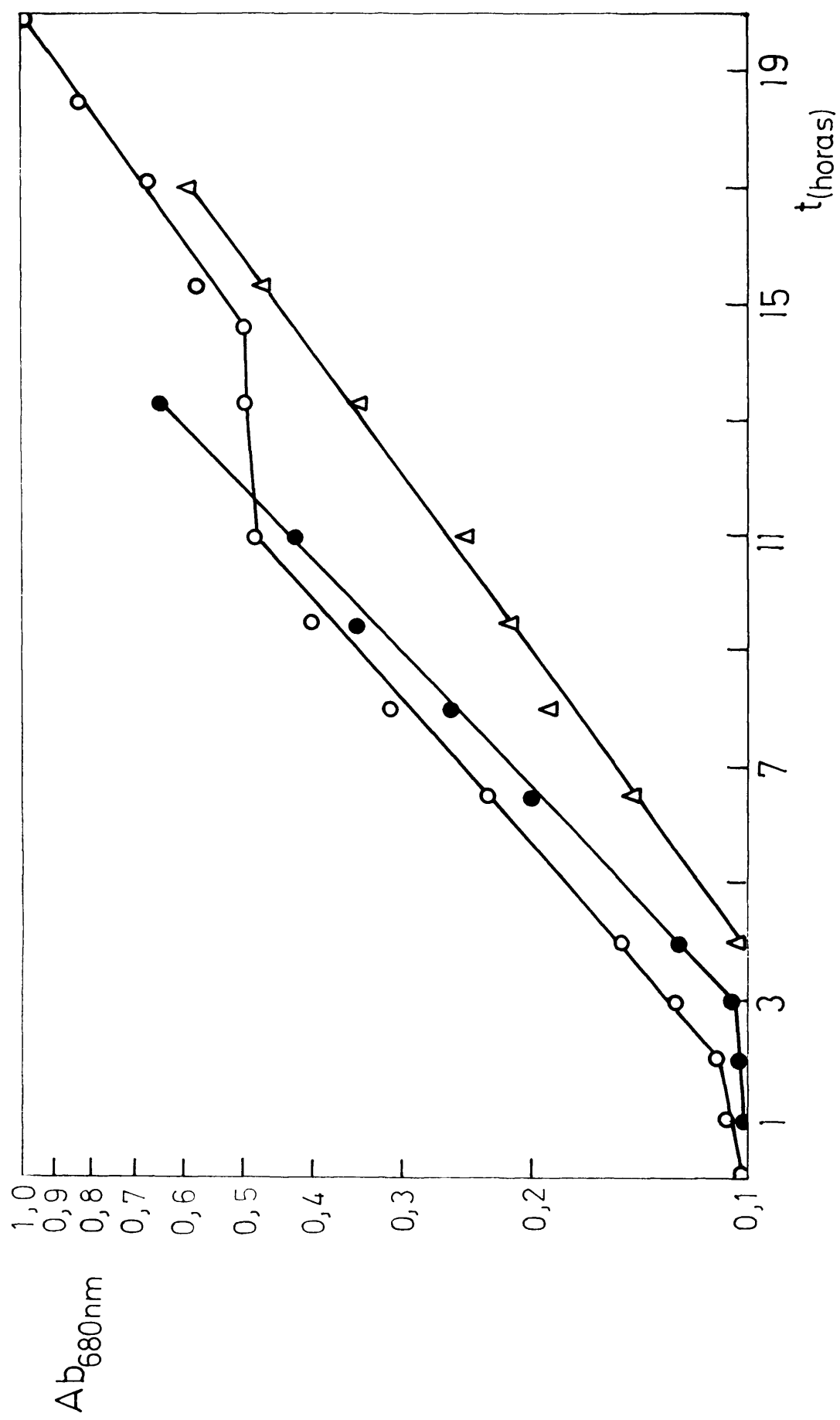


FIGURA 12. Representación semilogarítmica del crecimiento de *Salmonella typhimurium* LT2 sobre: propionato 20 mM ($-\Delta-$), acetato 30 mM ($-\bullet-$) ó propionato 10 mM + acetato 15 mM ($-\circ-$), procedente de precultivos en propionato 20 mM.

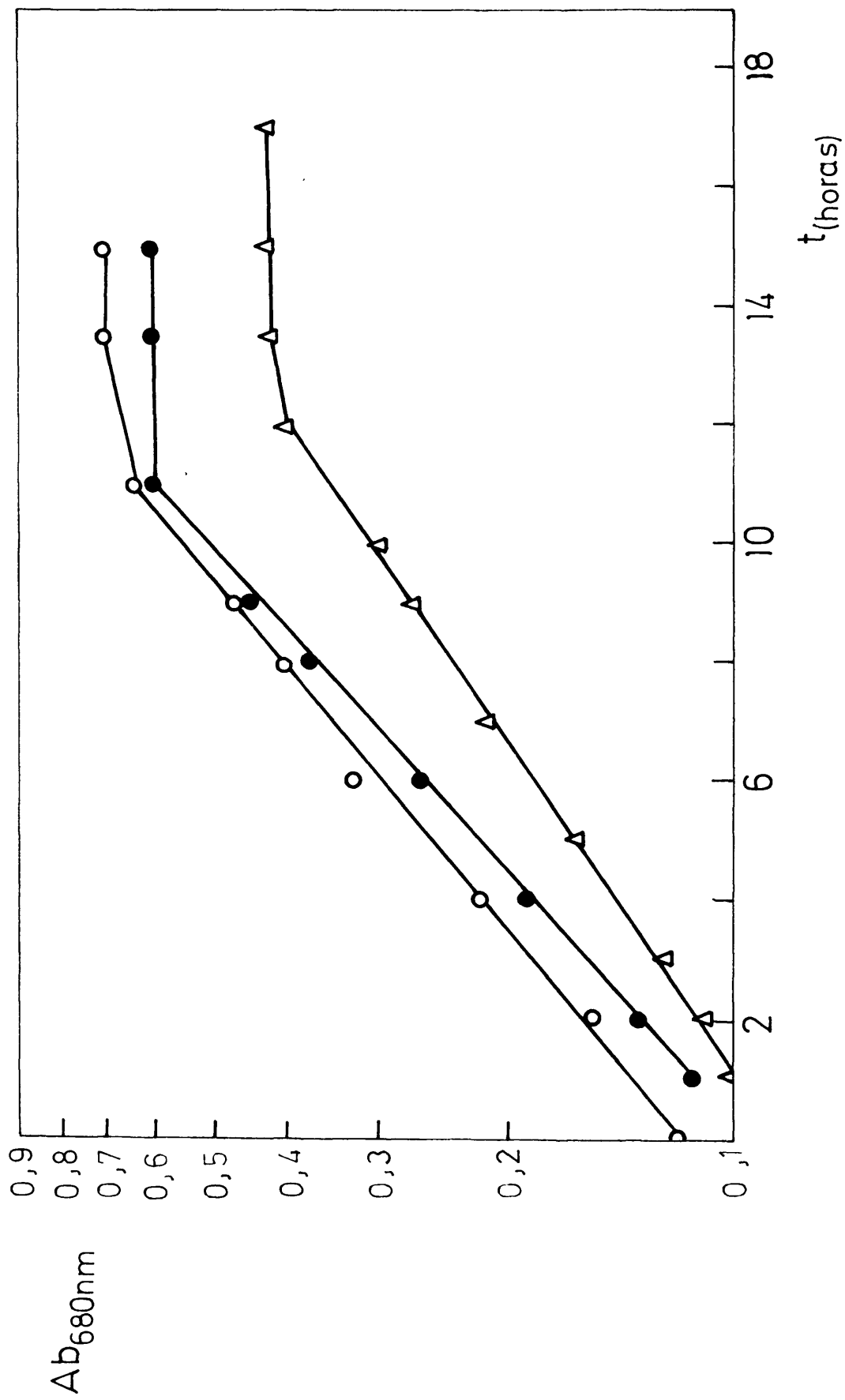


FIGURA 13. Representación semilogarítmica del crecimiento de *Salmonella typhimurium*

LT12 sobre: propionato 20 mM (○-○-○), acetato 30 mM (●-●-●) ó propionato 10 mM + acetato 15 mM (△-△-△), procedente de precultivos en propionato 10 mM + acetato 15 mM.

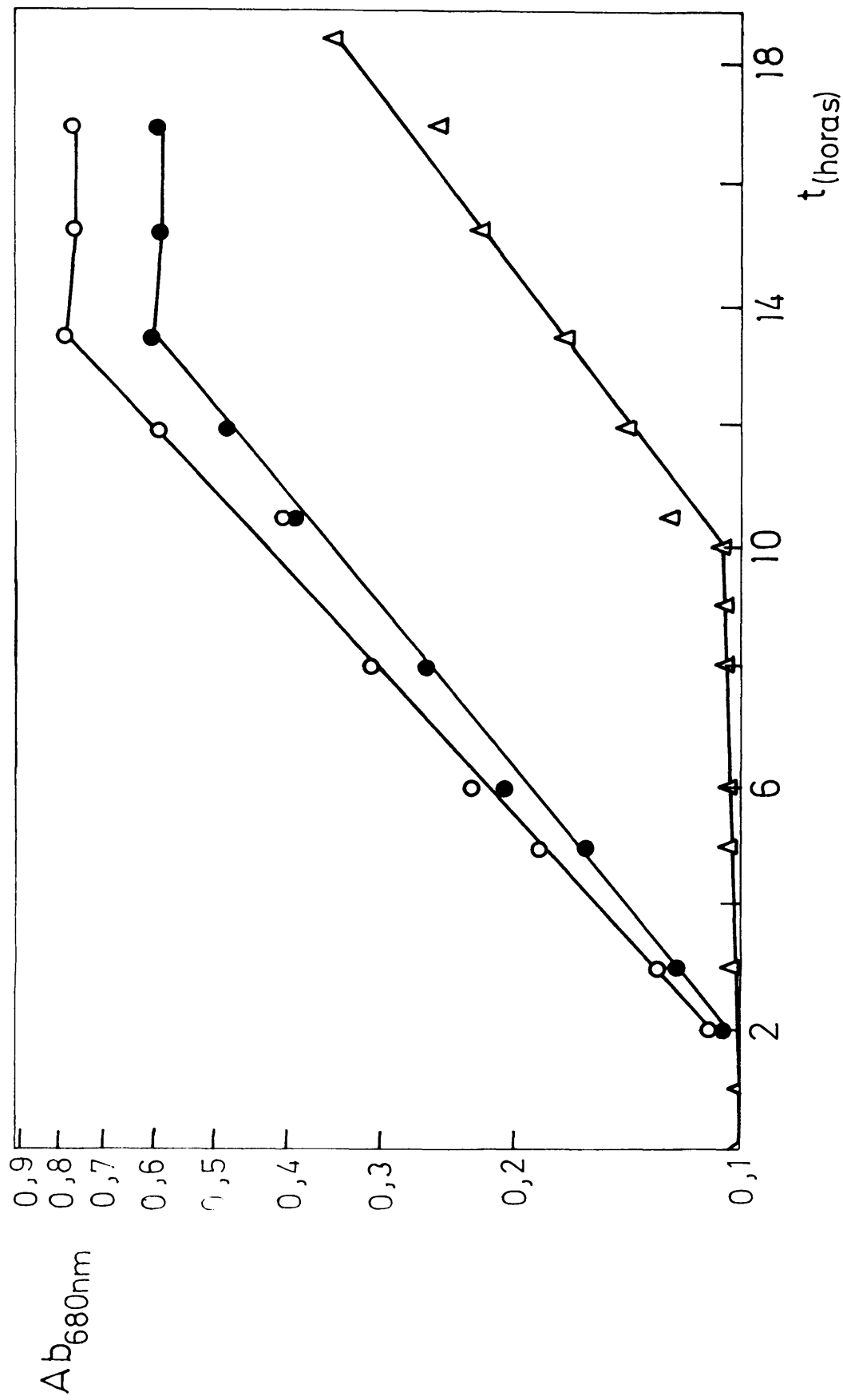


FIGURA 14. Representación semilogarítmica del crecimiento de Salmonella typhimurium LT2 sobre: propionato 20 mM (Δ-Δ-), acetato 30 mM (○-○-) ó propionato 10 mM + acetato 15 mM (●-●-), procedente de precultivos en acetato 30 mM.

una ligera inhibición de la velocidad de crecimiento sobre acetato si está presente el propionato. Esto induce a pensar que el propionato puede ser transportado al interior de la célula por el mismo sistema de transporte que el acetato. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Wagner y col. (1972) en E. coli W.

Experimentos similares realizados por Kay (1972) sobre E. coli K₁₂ cepas K_I y K_{II}, que han ganado la capacidad de crecer sobre propionato y que tienen el mismo sistema de transporte para acetato y propionato, muestran una inhibición semejante en el crecimiento de las células, pre-cultivadas en acetato, en acetato + propionato frente a las de acetato. Sin embargo, el periodo de adaptación del crecimiento en propionato es mucho menor que el encontrado por nosotros en las mismas condiciones. En E. coli, Kay demostró en experimentos posteriores la importancia del ciclo del glioxilato en el catabolismo del propionato en este microorganismo.

IV. 4. Oxidación de metabolitos por células crecidas en propionato, acetato y glicerol

El consumo de oxígeno durante la oxidación de intermediarios presuntamente implicados en la ruta puede proporcionar información acerca de si las enzimas que se

inducen durante el crecimiento en un sustrato están implicadas en el catabolismo de un metabolito determinado así como acerca de su sistema de transporte. Es decir, las velocidades a las que un compuesto se degrada deben ser compatibles con su velocidad de oxidación (Sección II. 1.4.).

IV. 4.1. Oxidación por células enteras

Con la idea anteriormente indicada, y en un intento de conocer cual de las posibles rutas alternativas del metabolismo del propionato es operativa en S. typhimurium, fueron analizadas las velocidades de oxidación de algunos posibles intermediarios y del glicerol. Por ello las células crecidas en propionato, glicerol ó acetato y preparadas según se indica en la Sección III. 2.6.. Las velocidades de oxidación de distintos compuestos se muestran en las Tablas VII, VIII y IX. Se puede observar que las células crecidas en propionato oxidan a la misma velocidad el propionato que el acetato, y el lactato a velocidad considerablemente inferior. Este hecho es indicativo de que el propionato induce un sistema de transporte común con el acetato (Kay, 1972 y 1978), y que este compuesto puede utilizar algunas de las reacciones del catabolismo del propionato o incorporarse directamente a una ruta catabólica central. El sistema propionato-acetato, de baja especificidad, pudiera transportar parcialmente al lactato

TABLA VII. Oxidación por células de S. typhimurium LT2
(1 mg aproximadamente) crecidas en propionato (20 mM)

SUSTRATO	CONCENTRACION	Q O ₂ (μl O ₂ /mg/hora)
Propionato	2 mM	154
	8 mM	150
Acetato	2 mM	134
	8 mM	128
Lactato	2 mM	53'60
	8 mM	57'00
Glicerol	2 mM	3'35
	8 mM	4'00
Propionil-CoA	0'2 mM	1'00
Acetil-CoA	0'2 mM	2'10

Los ensayos se realizaron según se describe en la Sección III. 2.6. Los datos expresados son la media aritmética de tres determinaciones.

TABLA VIII. Oxidación por células enteras de S. typhimurium LT2 (aproximadamente 1 mg) crecidas en glicerol (20 mM)

SUSTRATO	CONCENTRACION	Q O ₂ (μl O ₂ /mg/hora)
Glicerol	2'0 mM	124'0
	4'0 mM	121'1
Acetato	2'0 mM	9'4
	8'0 mM	13'4
Lactato	2'0 mM	10'7
	8'0 mM	10'7
Propionato	2'0 mM	2'7
	8'0 mM	4'0

Los ensayos se realizaron según se describe en la Sección III.2.6. Los datos expresados son la media aritmética de tres determinaciones.

TABLA IX. Oxidación por células enteras de S. typhimurium
 LT2 (1 mg aproximadamente) crecidas en acetato (50 mM)

SUSTRATO	CONCENTRACION	Q_{O_2} (μ l O_2 /mg/hora)
Acetato	2 mM	154
	8 mM	140
Glicerol	2 mM	0
	8 mM	0
Lactato	2 mM	13'40
	8 mM	26'80
Propionato	2 mM	0
	8 mM	0

Los ensayos se realizaron según se describe en la Sección III. 2.6. Los datos expresados son la media aritmética de tres determinaciones.

y oxidarse éste por un proceso semejante al acetato. En el caso del acetato (Tabla IX) las células únicamente oxidan el sustrato de crecimiento.

En los dos casos restantes estudiados, células crecidas en glicerol y acetato (Tablas VIII y IX), únicamente se oxidan a una velocidad significativa los sustratos de crecimiento. Es interesante destacar que las células crecidas en acetato no oxidan el propionato, aún cuando el sistema de transporte es el mismo, pero en este caso es lógico pensar que el acetato no induce las primeras enzimas (o enzimas diferenciales) de la ruta degradativa del propionato.

IV. 4.2. Oxidación por células permeabilizadas

Con el fin de eliminar el efecto de los sistemas de transporte y comprobar si alguno de los intermediarios se encuentran en la ruta degradativa del propionato, las células crecidas en propionato, acetato ó glicerol fueron permeabilizadas (según se indica en la Sección III. 2.9.) y utilizadas en análisis de velocidad de oxidación.

Del examen de la Tabla X se observa que las células permeabilizadas crecidas en propionato oxidan a la misma velocidad que este compuesto el acetato, lactato, y pro

TABLA X. Consumo de oxígeno por células de S. typhimurium LT2 (aproximadamente 1 mg), crecidas en propionato, acetato y glicerol, permeabilizadas con TE 10%

SUSTRATO DE CRECIMIENTO	SUSTRATO OXIDADO	Q O ₂ (μ l O ₂ /mg/hora)
Propionato (20 mM)	Lactato (2 mM)	75'0
	Propionato (2 mM)	78'1
	Propionato (2mM) + ATP (0'5mM)	78'0
	Propionil-CoA (0'20 mM)	72'2
	Acetato (2 mM)	80'2
	Glicerol (2 mM)	4'1
Glicerol (20 mM)	Glicerol (2 mM)	83'0
	Acetato (2 mM)	12'8
	Acetil-CoA (0'20 mM)	12'8
	Propionil-CoA (0'20 mM)	12'8
	Propionato (2 mM)	5'1
Acetato (30 mM)	Acetato (2 mM)	78'0
	Propionato (2 mM)	0'0
	Propionil-CoA (0'20 mM)	0'0
	Acetil-CoA (0'20 mM)	75'0

Las células permeabilizadas se obtuvieron según se describe en la Sección III. 2.9. Los datos expresados son la media aritmética de tres determinaciones.

pionil-CoA mientras que las de glicerol y acetato únicamente oxidan con velocidad significativa sus sustratos de crecimiento o sus compuestos activados.

El hecho de que el lactato sea oxidado a una velocidad semejante al propionato por células permeabilizadas y no por células enteras se puede interpretar como que este compuesto no es incorporado por el mismo sistema de transporte, semejante a lo que sucede en E. coli (Brown, 1972), pero o bien se incorpora directamente a una ruta central o bien puede ser un intermediario en la ruta catabólica del propionato.

Experimentos de respiración de células crecidas en propionato de E. coli E-26, E. coli K₁₂ cepas K_I y K_{II} y Moraxella lwoffii han sido descritos por Wegener, Reeves y Ajl (1967a), Wegener y col. (1968b), Hodgson y McGarry (1968b) y Kay (1972). Los resultados obtenidos por dichos autores concuerdan esencialmente con los obtenidos en los experimentos descritos en este trabajo sobre Salmonella ya que las células de estos microorganismos crecidos en propionato oxidan a una velocidad semejante el propionato y el acetato mientras los crecidos en acetato únicamente oxidan con una velocidad considerablemente alta este último compuesto. Este hecho podría deberse, quizás, a una represión catabólica del acetato sobre la inducción de las

enzimas necesarias para utilizar el propionato como frente de carbono.

IV. 5. Aislamiento de mutantes defectivos en propionato y sus revertientes: propiedades de crecimiento

Los resultados obtenidos en los apartados anteriores, parecen indicar que existe una relación entre determinados metabolitos (lactato, piruvato, acetato) y la ruta metabólica del propionato. Este hecho ha llevado a enfocar el estudio de la degradación del propionato mediante el aislamiento de mutantes defectivos y estudio de sus propiedades. Así pues en los últimos veinte años, este método ha servido para confirmar la ruta metabólica del propionato en distintas cepas de E. coli (W, E-26, K_{12}). De otras cepas de este organismo (K_{12} cepas K_I y K_{II}), incapaces de utilizar propionato, se han obtenido mutantes, que han ganado esa capacidad de crecimiento.

En mutantes, la ausencia de una enzima implicada en una ruta metabólica, conduce a una inhibición parcial o total del crecimiento; pero no sólo este hecho es importante, sino que se podrían analizar sus propiedades de crecimiento en otros sustratos y deducir la posible implicación de éstos en la ruta. Como ya se indicó en la Sección II. 1.7., la interpretación debe ser cauta. Ahora bien, la com

plementación de la metodología mutante con las determinaciones de las actividades de las distintas enzimas propuestas como claves en los mutantes y la comparación de sus niveles con los hallados para el tipo silvestre, llevará a confirmar la importancia de la ruta sugerida e incluso a identificar otras rutas secundarias relacionadas.

IV. 5.1. Mutantes y revertientes de S. typhimurium LT2

Se han obtenido mutantes y revertientes de la mencionada bacteria empleando distintos agentes mutagénicos, según se describe en Materiales y métodos.

IV. 5.1.1. Mutantes inducidos por 2-Aminopurina

Siguiendo la técnica ya descrita en la Sección III. 2.7.2.2. se realizaron cuatro mutaciones distintas empleando 2-AP como agente mutagénico, obteniéndose un mutante defectivo en propionato en uno de los ensayos y dos en otro ensayo. El bajo rendimiento puede ser debido a la escasa viabilidad de las células crecidas en presencia de 2-AP ó bien al bajo efecto mutagénico producido.

Además, los mutantes obtenidos presentaban un fenotipo complejo y altamente inestable, ya que se modificaba en un tiempo relativamente corto.

IV. 5.1.2. Mutantes inducidos por Etil metano sulfonato

El ensayo mutagénico con EMS se realizó según se describe en la Sección III. 2.7.2.1. obteniéndose colonias de tamaño apreciable en las placas correspondientes a las diluciones 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} de la suspensión celular mutagenizada, después del tratamiento con penicilina. Con 50 de estas colonias se realizó una replicación en placas con medio selectivo y no selectivo, comprobándose que sólomente dos de ellas eran incapaces de crecer en propionato. Con estas dos colonias se realizaron ensayos para conocer si eran capaces de crecer en distintos sustratos, en comparación con la cepa silvestre. Los resultados aparecen en la Tabla XI, en la que se indican los mutantes debidamente nomenclaturizados.

En base a asegurar que estas cepas correspondían a Salmonella y no a contaminantes, se realizó una biotipificación a nivel de especie comprobándose que realmente se trataba de este organismo.

Los fenotipos de estos mutantes sugieren la existencia de una cierta relación metabólica entre el propionato y el acetato, por lo cual era interesante comprobar si el mutante AA 202 poseía un fallo génico sencillo o doble. Esto se abordó intentando la obtención de revertientes es-

TABLA XI. Crecimiento de los mutantes AA 201, AA 202 y sus revertientes sobre distintas fuentes de carbono y energía.

SUSTRATO	<u>Salmonella</u> <u>typhimurium</u> LT2	AA 201	AA 202	Rev. <u>prp</u> ⁺ AA 201	Rev. <u>prp</u> ⁺ AA 202	Rev. <u>acet</u> ⁺ AA 202
Glucosa	++	++	++	++	++	++
Xilosa	++	++	++	++	++	++
Galactosa	++	++	++	++	++	++
Lactosa	-	-	-	-	-	-
Glioxilato	-	-	-	-	-	-
Glicolato	++	++	++	++	++	++
Succinato	++	++	++	++	++	++
Glicerol	++	++	++	++	++	++
Lactato	++	++	++	++	++	++
Piruvato	++	++	++	++	++	++
Acetato	++	++	-	++	++	++
Propionato	++	-	-	++	++	++

El crecimiento se realizó en medio sólido y en condiciones estándar.

El signo negativo corresponde a no crecimiento; los positivos, crecimiento a las 24 horas (++) y a las 72 horas (+).

pontáneos, sembrando el AA 201 en placas de propionato y el AA 202 en placas de propionato y de acetato separadamente y manteniéndolas en condiciones normales de incubación durante 72 horas. En las tres placas se obtuvieron revertientes que se sometieron a comprobación fenotípica (Tabla XI).

Como se puede apreciar en dicha Tabla todos los revertientes recuperan el fenotipo silvestre, con lo cual se podría deducir que o un solo cambio produce la incapacidad de crecimiento en acetato y propionato o bien el AA 202 estaría afectado en el sistema de transporte o los "revertientes" eran contaminantes de la cepa silvestre.

IV. 5.2. Mutantes S. typhimurium LT2 tim⁻

Ante el problema suscitado en el apartado anterior, y que no permitía llegar a conclusiones precisas, se intentó la obtención de cepas auxótrofas de Salmonella, con un marcador necesariamente presente en mutantes y revertientes. Se eligió la auxotrofía para la timina por ser fácilmente obtenible por el método descrito del trimetoprim (TMBP).

El proceso de obtención de S. typhimurium LT2 tim⁻ se realizó siguiendo el método descrito en la Sección

III. 2.7.1. y condujo a la aparición de colonias auxótrofas con una frecuencia muy baja, quizá por resistencia al trimetoprim (Poe y col., 1979), cuyo fenotipo se comprobó y caracterizó como de Salmonella, eligiéndose una de ellas para su posterior utilización como cepa base en mutaciones para obtener deficientes en propionato.

IV. 5.3. Mutantes de Salmonella typhimurium tim^- prp^- y sus revertientes

Una vez obtenida la cepa auxótrofa tim^- de S. typhimurium se realizó una mutagénesis normal con EMS, según el procedimiento ya descrito (Sección III. 2.7.2.1.). Un centenar de las colonias crecidas en las placas correspondientes a las diluciones 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} y 10^{-5} de la suspensión celular tratada se sometieron a replicación en placa resultando ser propionato-negativas únicamente dos de ellas.

En estas dos colonias se procedió a su caracterización como pertenecientes al género Salmonella y auxotrofía para timina. Asimismo, se analizó su fenotipo observándose el crecimiento en distintas fuentes de carbono y energía, y siempre frente a un control (Tabla XII).

A los mutantes se les asignó un nombre según las

TABLA XII. Características de crecimiento de los mutantes AA 301 y AA 302 en distintas fuentes de carbono y energía.

SUSTRATO	<u>S. typhimurium</u> LT2 <u>tim⁻</u>	AA 301	AA 302
Glucosa	-	-	-
Glucosa + Timina	++	++	++
Xilosa + Timina	++	++	++
Galactosa + Timina	++	++	++
Lactosa + Timina	-	-	-
Glioxilato + Timina	-	-	-
Glicolato + Timina	+	+	+
Succinato + Timina	++	++	+
Glicerol + Timina	++	++	++
Lactato + Timina	++	++	-
Piruvato + Timina	++	++	++
Acetato + Timina	++	-	-
Propionato + Timina	++	-	-

El crecimiento se realizó en medio sólido suplementado con 0'5 mg/ml de timina y en condiciones estándar. El signo negativo corresponde a no crecimiento; los positivos, crecimiento a las 24 horas (++) y a las 72 horas (+).

normas vigentes de nomenclatura (Demerec y col., 1966): al prp⁻acet⁻, AA 301 y al prp⁻acet⁻lact⁻, AA 302.

En la Tabla XIII se expresa el fenotipo de los revertientes de los mutantes AA 301 y AA 302 en los sustratos en que eran incapaces de crecer. Se observa que se obtienen revertientes (con frecuencia 10^{-7}) únicamente en algunos de ellos: AA 301 prp⁺, AA 302 lact⁺ y AA 301 acet⁺.

De estos resultados se deduce que el AA 302 es un doble mutante dado que todos sus revertientes lact⁺ se comportan fenotípicamente igual que el AA 301, ya que los revertientes que ganan la capacidad de crecer en uno de los dos sustratos en los que es defectivo crecen también en el otro. Esto lleva a suponer o que son mutantes en el sistema de transporte, que como se ha indicado es el mismo para ambos compuestos, o bien que alguna de las enzimas implicadas en el metabolismo del acetato interviene en el metabolismo del propionato. Si ésto último fuera cierto no nos sería posible aislar mutantes con fenotipo prp⁺acet⁻, a menos que fueran defectivos en el sistema de activación del acetato, que sería el único paso diferencial.

El hecho de solo haber obtenido dos mutantes con fenotipos distintos indujo a realizar más ensayos mutagénicos. Con objeto de aislar un amplio abanico fenotípico de

TABLA XIII. Características de crecimiento de los revertientes de AA 301 y AA 302 en distintas fuentes de carbono y energía.

SUSTRATO	<u>S. typhimurium</u> LT2 <u>tim</u> ⁻	Rev. AA 301 <u>prp</u> ⁺	Rev. AA 301 <u>acet</u> ⁺	Rev. AA 302 <u>lact</u> ⁺
Glucosa	-	-	-	-
Glucosa + Timina	++	++	++	++
Xilosa + Timina	++	++	++	++
Galactosa + Timina	++	++	++	++
Lactosa + Timina	-	-	-	-
Glioxilato + Timina	-	-	-	-
Glicolato + Timina	+	+	+	+
Succinato + Timina	++	++	++	-
Glicerol + Timina	++	++	++	++
Lactato + Timina	++	++	++	++
Piruvato + Timina	++	++	++	++
Acetato + Timina	++	++	++	-
Propionato + Timina	++	++	++	-

El crecimiento se realizó en medio sólido suplementado con 0'5 mg/ml de timina y en condiciones estándar.

El signo negativo corresponde a no crecimiento; los positivos, crecimiento a las 24 horas (++) y a las 72 horas (+).

mutantes, que proporcionará la mayor información posible sobre la ruta estudiada, se realizaron nuevos ensayos utilizando el mismo agente mutagénico. Provenientes de tres procesos mutagénicos distintos, se obtuvo y caracterizó fenotípicamente un conjunto de mutantes, de los cuales, los de fenotipo estable se muestran (debidamente nomenclaturizados) en las Tablas XIV, XV, XVI y XVII. Estas Tablas incluyen, asimismo, el resultado de otro ensayo mutagénico empleando como fuente de carbono selectiva el acetato.

Comparando los fenotipos de los mutantes obtenidos se observa que los AA 303, AA 304, AA 305, AA 310 crecen en todos los sustratos glucolíticos y gluconeogénicos menos en propionato. Estos mutantes no parecen estar afectados en el transporte ya que crecen en acetato. Así, si las rutas degradativas de acetato y propionato estuvieran relacionadas, dichos mutantes serían defectivos en la secuencia no común de aquellas rutas. Por otra parte, si no estuvieran afectados en la primera enzima de la ruta se eliminaría la posibilidad de una dualidad alternativa entre rutas, como algunos autores señalan al indicar que en las primeras etapas de crecimiento se utiliza la ruta del succinato y, posteriormente, la del acrilato. Nuestros resultados anteriores muestran que tal dualidad no parece existir, que no se utiliza la ruta de carboxilación y además que la deficiencia en un sólo paso (reversión con fre-

TABLA XIV. Características de crecimiento de los mutantes de AA 303, AA 304, AA 305 y AA 306 en distintas fuentes de carbono.

SUSTRATO	<u>S.typhimurium</u> <u>LT2 tim⁻</u>	AA 303	AA 304	AA 305	AA 306
Glucosa	-	-	-	-	-
Glucosa + Timina	++	++	++	++	++
Xilosa + Timina	++	++	++	++	
Galactosa + Timina	++	++	++	++	++
Lactosa + Timina	-	-	-	-	-
Succinato + Timina	++	++	++	++	++
Citrato + Timina	++	++	++	+	++
Glicerol + Timina	++	++	++	++	++
Lactato + Timina	++	++	++	++	-
Piruvato + Timina	++	++	++	++	-
Acetato + Timina	++	++	++	++	-
Propionato + Timina	++	-	-	-	-
Laurato + Timina	++	-	-	-	++

El crecimiento se realizó en medio sólido suplementado con 0'5 mg/ml de timina y en condiciones estándar.

El signo negativo corresponde a no crecimiento; los positivos, crecimiento a las 24 horas (++) y a las 72 horas (+) y la ausencia de signo a comprobación no realizada.

TABLA XV. Características de crecimiento de los mutantes de AA 307, AA 308, AA 309 y AA 310 en distintas fuentes de carbono.

SUSTRATO	<u>S.typhimurium</u> <u>LT2 tim</u>	AA 307	AA 308	AA 309	AA 310
Glucosa	-	-	-	-	-
Glucosa + Timina	++	++	++	++	++
Xilosa + Timina	++	++		++	++
Galactosa + Timina	++	++	++	++	++
Lactosa + Timina	-	-	-	-	-
Succinato + Timina	++	-	-	-	++
Citrato + Timina	++	-	+	+	++
Glicerol + Timina	++	++	++	++	++
Lactato + Timina	++	++	++	++	++
Piruvato + Timina	++	++	++	++	++
Acetato + Timina	++	-	-	-	++
Propionato + Timina	++	-	-	-	-
Laurato + Timina	++	-	-	-	+

El crecimiento se realizó en medio sólido suplementado con 0'5 mg/ml de timina y en condiciones estándar.

El signo negativo corresponde a no crecimiento; los positivos, crecimiento a las 24 horas (++) y a las 72 horas (+) y la ausencia de signo a comprobación no realizada.

TABLA XVI. Características de crecimiento de los mutantes de AA 313, AA 314, AA 315 y AA 316 en distintas fuentes de carbono.

SUSTRATO	<u>S.typhimurium</u> <u>LT2 tim</u>	AA 313	AA 314	AA 315	AA 316
Glucosa	-	-	-	-	-
Glucosa + Timina	++	++	++	++	++
Xilosa + Timina	++	++	++	++	++
Galactosa + Timina	++	++	++	++	++
Lactosa + Timina	-	-	-	-	-
Succinato + Timina	++	-	-	-	++
Citrato + Timina	++	++	++	+	++
Glicerol + Timina	++	++	++	++	++
Lactato + Timina	++	++	++	++	++
Piruvato + Timina	++	++	++	++	++
Acetato + Timina	++	-	-	-	-
Propionato + Timina	++	++	++	++	++
Laurato + Timina	++	-	-		

El crecimiento se realizó en medio sólido suplementado con 0'5 mg/ml de timina y en condiciones estándar.

El signo negativo corresponde a no crecimiento; los positivos, crecimiento a las 24 horas (++) y a las 72 horas (+) y la ausencia de signo a comprobación no realizada.

TABLA XVII. Características del crecimiento de los mutantes de AA 318, AA 319, AA 320 y AA 321 en distintas fuentes de carbono y energía.

SUSTRATO	<u>S.typhimurium</u> <u>LT2 tim⁻</u>	AA 318	AA 319	AA 320	AA 321
Glucosa	-	-	-	-	-
Glucosa + Timina	++	++	++	++	++
Xilosa + Timina	++	++	++	++	++
Galactosa + Timina	++	++	++	++	++
Lactosa + Timina	-	-	-	-	-
Succinato + Timina	++	-	-	++	++
Citrato + Timina	++	++	-	++	++
Glicerol + Timina	++	++	++	++	++
Lactato + Timina	++	++	+	-	-
Piruvato + Timina	++	++	++	-	-
Acetato + Timina	++	-	-	-	++
Propionato + Timina	++	-	-	-	-
Laurato + Timina	++	-	-		

El crecimiento se realizó en medio sólido suplementado con 0'5 mg/ml de timina y en condiciones estándar.

El signo negativo corresponde a no crecimiento; los positivos, crecimiento a las 24 horas (++) y a las 72 horas (+) y la ausencia de signo a comprobación no realizada.

cuencia de 10^{-8}) produce la incapacidad de crecimiento.

En un posterior ensayo mutagénico, en el que se modificaron las condiciones de selección, se obtuvo el mutante AA 316 defectivo en acetato. Para comprobar la posibilidad de que estuviera afectado en el primer paso de la ruta del acetato, se comprobó su capacidad de utilizar como sustrato el ácido laúrico (de 12 átomos de carbono), el cual es metabolizado por la cepa silvestre (Gutnick y col., 1969). Este hecho podría ser indicativo de que tanto la isocitrato liasa como la malato sintasa no se encuentran afectadas, por ser ruta obligada para la gluconeogénesis en Enterobacteriaceas a partir de ácidos grasos. La incapacidad de AA 316 de crecer sobre laurato indica que el mutante puede encontrarse afectado en alguna de las enzimas del ciclo del ácido glioxílico. Por otra parte, el crecimiento sobre propionato sugiere que dichas enzimas no son esenciales en el catabolismo de este compuesto.

El análisis fenotípico de los mutantes AA 313, AA 314 y AA 315 muestra que son defectivos en el metabolismo del acetato y del succinato. Esto plantea la cuestión de si están afectados en el ciclo de Krebs, lo cual se puede descartar ya que son capaces de crecer en otros sustratos (glicerol, glucosa, etc.) que son metabolizados via dicho ciclo. Por ello se ha llegado a la conclusión de que

podrían estar afectados en la ruta gluconeogénica, y concretamente en la PEP carboxiquinasa que cataliza la formación de PEP a partir de oxalacetato. Este hecho se comprueba ensayando el crecimiento en oxalacetato y observando que no son capaces de utilizar este compuesto, eliminándose así la posibilidad de una mutación doble o de estar afectados en transporte o en ambas rutas catabólicas.

Los mutantes AA 308, AA 309 y AA 318, además de mostrar un fenotipo como el de los anteriores, son defectivos también en el metabolismo del propionato. Este fenotipo parece ser debido a dos mutaciones puntuales, una idéntica a la de los AA 313, AA 314 y AA 315 y otra en alguno de los pasos específicos del catabolismo del propionato. Este hecho se confirmó analizando los revertientes suc⁺, que aparecen con frecuencia de 2×10^{-7} , y que crecen sobre acetato y no sobre propionato. Asimismo, revertientes prp⁺, obtenidos con semejante frecuencia, permanecen sin crecer en los otros dos sustratos.

Siguiendo con este tipo de análisis se observa otro bloque importante de mutantes, que aparece repetidamente, y que se caracterizan fundamentalmente por su ausencia de crecimiento en propionato, lactato y piruvato. Es interesante destacar que S. typhimurium (Cooper y Kornberg, 1965, 1967; Cooper, 1969) cuando crece sobre piruva-

to o lactato como fuente de carbono y energía utiliza como vía metabólica aquella que implica a la PEP sintetasa como enzima esencial. Los mutantes defectivos en PEP sintetasa (pps⁻) son por tanto incapaces de crecer en lactato y piruvato.

Estas consideraciones llevan a pensar en una posible implicación de esta enzima en el metabolismo del propionato. Por ello se analizaron distintos mutantes (obtenidos con fuente selectiva lactato) caracterizados como pps⁻, en cuanto a su comportamiento en la utilización de propionato. En la Tabla XVIII se expresan los fenotipos de estos pps⁻ estudiados, los cuales derivan de una cepa de S. typhimurium auxótrofa para la leucina (leu 39).

Asimismo, se analizó otro mutante (AG 517), aislado como pps⁻ en anteriores trabajos (Mella y Garrido-Per tierra, 1980), el cual deriva de la cepa silvestre de S. typhimurium LT2 y cuyo fenotipo se muestra en la Tabla XIX.

Resulta muy sugerente observar que todos los mutantes pps⁻ estudiados presentan un fenotipo, obtenido con frecuencia relativamente alta en el aislamiento de cepas deficientes en la ruta del propionato, con ausencia de crecimiento sobre acetato, propionato, lactato y piruvato.

TABLA XVIII. Características del crecimiento de los mutantes I8, B₂₁, A₁ y 4017 en distintas fuentes de carbono y energía

SUSTRATO	<u>S. typhimurium</u> LT2	I8	B 21	A 1	4017
	Leu 39				
Medio Luria	++	+++	++	++	++
Lactato + Glicerol	-	-	-	-	-
Lactato + Glicerol + Leucina	++	++	++	++	++
Glicerol	-	-	-	-	-
Glicerol + Leucina	++	++	++	++	++
Succinato + Leucina	++	++	++	++	++
Lactato + Leucina	++	-	-	-	-
Piruvato + Leucina	++	-	-	-	-
Acetato + Leucina	++	-	-	-	-
Propionato + Leucina	++	-	-	-	-

El crecimiento se realizó en medio sólido, suplementado con 0'5 mg/ml de leucina, y en condiciones estándar.

Los signos corresponden: los negativos, a falta de crecimiento y los positivos, a crecimiento a las 24 horas (++) .

TABLA XIX. Características del crecimiento de AG 517 y sus revertientes en distintas fuentes de carbono y energía

SUSTRATO	<u>S. typhimurium</u> LT2	AG 517	AG 517 <u>lact</u> ⁺	AG 517 <u>acet</u> ⁺	AG 517 <u>prp</u> ⁺
Glucosa	++	++	++	++	++
Lactosa	-	-	-	-	-
Glicerol	++	++	++	++	++
Lactato + Glicerol	++	++	++	++	++
Succinato	++	++	++	++	++
Lactato	++	-	+	-	+*
Piruvato	++	-	+	-	+*
Acetato	++	-	+	+	+
Propionato	++	-	-	+*	+

El crecimiento se realizó en medio sólido y condiciones estándar.

Los signos corresponden: los negativos, a falta de crecimiento, los positivos, a crecimiento a las 24 horas (++) y a las 72 horas (+), y (+*) crecimiento menor que S. typhimurium y mayor que AG 517.

Este comportamiento condujo a un estudio más amplio de dichas cepas mutantes, con obtención de distintos revertientes. En esta fase de estudio es interesante destacar que se han identificado dos tipos distintos de mutantes pps⁻:

- 1.- Los denominados pps C que mapean en el minuto 5 del mapa de ligamiento de Salmonella y que se encuentran afectados en el gen regulador de la síntesis de PEP sintetasa y que muestran un comportamiento complejo.
- 2.- Los denominados pps A que mapean en el minuto 40 y están afectados en el gen estructural de la PEP sintetasa.

Los mutantes B-21, I8 y 4017 se encuentran afectados en el gen regulador, mientras A lo está en el gen estructural (Cooper, comunicación personal). El comportamiento de los mutantes pps C y pps A es distinto frente a la reversión, ya que los primeros proporcionan dos tipos de revertientes sobre lactato: unos de colonias de gran tamaño (seleccionadas a 30°C) que resultan ser pps constitutivos y otras de pequeño tamaño que continúan siendo pps⁻, pero son isocitrato liasa constitutivos; por el contrario, los pps A solo dan revertientes del segundo tipo.

En los experimentos de reversión se utilizaron un mutante pps⁻ de cada clase, el AG 517 y el AA 306, obteniéndose distintos revertientes que fueron probados en sus

capacidades de crecimiento sobre otros sustratos y en algunos casos utilizados para la obtención de dobles revertientes. El fenotipo de los revertientes obtenidos se muestra frente a un control en las Tablas XIX, XX, XXI y XXII asignadas respectivamente a AG 517, A₁, 4017 y AA 306.

Del examen de estas Tablas se puede deducir a través del estudio de revertientes en lactato y propionato que los A₁ y AG 517 parecen tener una mutación de la misma naturaleza. Un hecho que llama la atención, y al que no se ha encontrado una explicación convincente, es por qué la mayoría de los mutantes defectivos en PEP sintetasa son incapaces de crecer en acetato. Esta observación, apoyada por el hecho de que todos los revertientes lact⁺ ganan la capacidad de crecer en acetato, parece indicar que el metabolismo de estos compuestos se encuentra muy relacionado, sin embargo, los revertientes AG 517 acet⁺ sin crecer en lactato y piruvato crecen en acetato casi a la misma velocidad que la cepa salvaje.

De la misma forma, podría pensarse que el metabolismo del propionato se encuentra relacionado con el del lactato y acetato, ya que la mayor parte de los mutantes obtenidos utilizando como medio selectivo propionato son incapaces de crecer en acetato y lactato y los revertientes prp⁺ ganan también la capacidad de crecer en estos com

TABLA XX. Características del crecimiento de los revertientes de A_1 en distintas fuentes de carbono y energía

SUSTRATO	A_1	A_1 <u>lact</u> ⁺	A_1 <u>prp</u> ⁺ (G2)
Glucosa	-	-	-
Glucosa + Leucina	++	++	++
Lactosa + Leucina	-	-	-
Lactato + Glicerol + Leucina	++	++	++
Glicerol + Leucina	++	++	++
Succinato + Leucina	++	++	++
Lactato + Leucina	-	+	+
Piruvato + Leucina	-	+	+
Acetato + Leucina	-	+	+
Propionato + Leucina	-	-	+

El crecimiento se realizó en medio sólido suplementado con 0'5 mg/ml de leucina y en condiciones estándar.

Los signos corresponden: los negativos, a falta de crecimiento y los positivos, crecimiento a las 24 horas (++) y a las 72 horas (+).

TABLA XXI. Características del crecimiento de los revertientes de 4017 en distintas fuentes de carbono y energía

SUSTRATO	4017	4017 <u>lact</u> ⁺ grandes	4017 <u>lact</u> ⁺ pequeñas
Glucosa	-	-	-
Glucosa + Leucina	++	++	++
Lactosa + Leucina	-	-	-
Lactato + Glicerol + Leucina	++	++	++
Glicerol + Leucina	++	++	++
Succinato + Leucina	++	++	++
Lactato + Leucina	-	++	+
Piruvato + Leucina	-	++	+
Acetato + Leucina	-	++	+
Propionato + Leucina	-	++	-

El crecimiento se realizó en medio sólido suplementado con 0'5 mg/ml de leucina y en condiciones estándar.

Los signos corresponden: los negativos, a falta de crecimiento y los positivos, crecimiento a las 24 horas (++) y a las 72 horas (+).

TABLA XXII. Características del crecimiento de los revertientes de AA 306 en distintas fuentes de carbono y energía

SUSTRATO	AA 306	AA 306 <u>lact</u> ⁺	AA 306 <u>prp</u> ⁺
Glucosa	-	-	-
Glucosa + Timina	++	++	++
Lactosa + Timina	-	-	-
Lactato + Glicerol + Timina	++	++	++
Glicerol + Timina	++	++	++
Succinato + Timina	++	++	++
Lactato + Timina	-	+	+
Piruvato + Timina	-	+	+
Acetato + Timina	+	+	+
Propionato + Timina	-	+	+

El crecimiento se realizó en medio sólido suplementado con 0'5 mg/ml de leucina y en condiciones estándar.

Los signos corresponden: los negativos, a falta de crecimiento y los positivos, crecimiento a las 24 horas (++) y a las 72 horas (+).

puestos. Wegener y col. (1969) han investigado el papel de la PEP carboxilasa y el ciclo del glioxilato en el metabolismo del propionato en E. coli E-26 y K₁₂, deduciéndose que las actividades PEP carboxilasa y PEP sintetasa son necesarias en las primeras etapas del crecimiento y que posteriormente entra en acción el ciclo del glioxilato. Sin embargo, estos mismos autores sostienen que el metabolismo del propionato en E. coli W transcurre a lo largo de todo el proceso de crecimiento sin estar implicado el ciclo del glioxilato. Ellos llegan a la conclusión utilizando un mutante defectivo en isocitrato liasa, y en cuyos extractos celulares observan la presencia de alta actividad PEP sintetasa de células crecidas en propionato. Por otra parte, Kay (1972) en mutantes E. coli K₁₂ cepas K_I y K_{II} que han ganado la capacidad de crecer en propionato sugieren que la actividad isocitrato liasa y, por lo tanto, el ciclo del glioxilato son esenciales en el catabolismo del propionato.

IV. 6. Determinaciones de las actividades enzimáticas

De las tres rutas descritas para la degradación del propionato en E. coli, se ha visto, a través de los estudios de crecimiento, que la ruta de carboxilación a succinato no parece ser utilizada por Salmonella.

Aprovechando que las enzimas implicadas en una

ruta degradativa de un sustrato, que no entra directamente en las rutas centrales, se inducen cuando utiliza como fuente de carbono y energía este sustrato, se ha determinado la actividad enzimática de las enzimas de las rutas del α -hidroxiglutarato y del acrilato, así como de aquellas que catalizan posibles reacciones de interconexión entre ambas. Para determinar las actividades enzimáticas en los extractos celulares, las bacterias crecidas en los diferentes sustratos suplementados con 0'015% de extracto de levadura, han sido tratadas según se indica en la Sección III. 2.8.

IV. 6.1. Activación del propionato intracelular

La activación del propionato intracelular es la primera reacción propuesta en el catabolismo de este compuesto, común para las rutas catabólicas descritas en bacterias. En esta transformación se encuentran implicadas dos enzimas: ATP-monocarboxilatofosfotransferasa y acil-CoA ortofosfato aciltransferasa.

En la Tabla XXIII se muestran las actividades de la ATP-monocarboxilatofosfotransferasa en extractos de células de S. typhimurium crecidas sobre propionato y acetato. Se puede apreciar en dicha Tabla que las actividades de las células crecidas en propionato son ligeramente más

TABLA XXIII. Actividad de la ATP-monocarboxilato fosfo-
transferasa en extractos de S. typhimurium LT2

SUSTRATO DE CRECIMIENTO	SUSTRATO DE ENSAYO	ACTIVIDAD ENZIMATICA (μ mol hidroxamato/mg/h)
PROPIONATO	Propionato	0'000
	Propionato + ATP	0'360
	Acetato	0'000
	Acetato + ATP	0'600
	Propionato + ATP + CoA	0'054
ACETATO	Propionato	0'000
	Propionato + ATP	0'300
	Acetato	0'000
	Acetato + ATP	0'470

Los ensayos fueron realizados según se describe en la Sec-
ción III. 2.11.1.1.

Los datos expresados son media de tres determinaciones.

altas que las de las células crecidas en acetato. De todas formas no hay diferencias notables cuando se utilizan acetato y propionato indistintamente como sustratos de crecimiento y de la reacción, y éste puede ser un hecho significativo de que ambos compuestos inducen un sistema de activación que actúe sobre ellos.

Los productos de la activación de estos compuestos parecen ser el propionil-fosfato y el acetil-fosfato ya que como se observa en dicha Tabla, a través de la concentración de hidroxamatos, se requiere la presencia de ATP y no de CoA.

El bajo valor encontrado en la formación de hidroxamato con ATP y CoA puede ser debido a un acoplamiento de las enzimas implicadas en la activación y a la presencia de una hidrolasa que en extractos de M. lwoffi ha sido descrito por Hodgson y McGarry (1968b).

Las actividades de la acil-CoA ortofosfato aciltransferasa de los extractos celulares de S. typhimurium se expresan en la Tabla XXIV. Se puede apreciar fácilmente que la reacción requiere esencialmente CoA y que los niveles de actividad para el acetil-fosfato y propionil-fosfato son semejantes y relativamente independientes del sustrato de crecimiento (acetato ó propionato).

TABLA XXIV. Actividad acil-CoA ortofosfato aciltransferasa en extractos de S. typhimurium LT2

SUSTRATO DE CRECIMIENTO	SUSTRATO DE ENSAYO	COFACTOR	ACTIVIDAD ENZIMATICA (μ mol hidroxamato desapar./mg/h)
PROPIONATO	Acetil-fosfato	CoA	0'4600
		-	0'0012
	Propionil-fosfato	CoA	0'4700
		-	0'0009
ACETATO	Acetil-fosfato	CoA	0'2400
		-	0'0010
	Propionil-fosfato	CoA	0'2900
		-	0'0009

Los ensayos fueron realizados según se describe en la Sección III. 2.11.1.2.

Los datos expresados son la media aritmética de tres determinaciones.

Del examen comparativo de las tablas se puede apreciar que los niveles de actividad de las enzimas implicadas en la activación son similares, pudiendo interpretarse que a través de su acción acoplada, el propionato intracelular se convierte en propionil-CoA.

Estos resultados son semejantes a los descritos en Moraxella lwoffii por Hodgson y McGarry (1968b), aunque en este caso los niveles de las actividades enzimáticas son aproximadamente seis veces superiores a los encontrados en Salmonella. Excluyendo la ruta catabólica para propionato en tejidos animales propuesta por Mahler y Huennekens (1953) todas las demás rutas implican la activación del propionato; en la mayoría de los casos descritos este compuesto se activa por un sistema dependiente de ATP (Flavin y col., 1955, 1956, 1957; Giovanelly y Stumpf, 1957; Rendina y Coon, 1957; Vagelos, Earl y Stadtman, 1959b; Reeves y Ajl, 1962; Richards y Lloyd, 1966; Sokatch, 1967; Callely y Lloyd, 1964; Wegener, Reeves y Ajl, 1967a y b; Kay, 1972). Sin embargo, es necesario indicar que Baldwin y col. (1961 y 1965) describen la intervención de una CoA-transferasa en el proceso de activación.

IV.6.2. Actividades de las enzimas de la ruta del α -hidroxiglutarato a succinato

IV.6.2.1. Actividad α -hidroxiglutarato sintasa

La actividad de esta enzima se determinó en extractos de S. typhimurium crecida en propionato midiendo el descenso de la concentración de los sustratos en función del tiempo. Se puede observar en la Figura 15 (A y B) que la concentración de propionil-CoA disminuye, aunque en la mezcla de reacción no se adicione glioxilato, mientras la concentración de este último permanece constante. Estos datos difieren notablemente de los obtenidos en E. coli E-26 por Reeves y Ajl (1962), donde ambos sustratos se transforman equimolarmente, deteniéndose la reacción en ausencia de uno de ellos.

El empleo de cromatografía en papel para intentar identificar el α -hidroxiglutarato como producto de la reacción resultó negativo, tanto cuando se realizó el ensayo con extractos celulares, extractos tratados térmicamente o en ausencia de un sustrato (prp-CoA ó glioxilato).

Como consecuencia de estos resultados se puede pensar que la actividad α -hidroxiglutarato sintasa no se encuentra presente en los extractos de S. typhimurium cre-

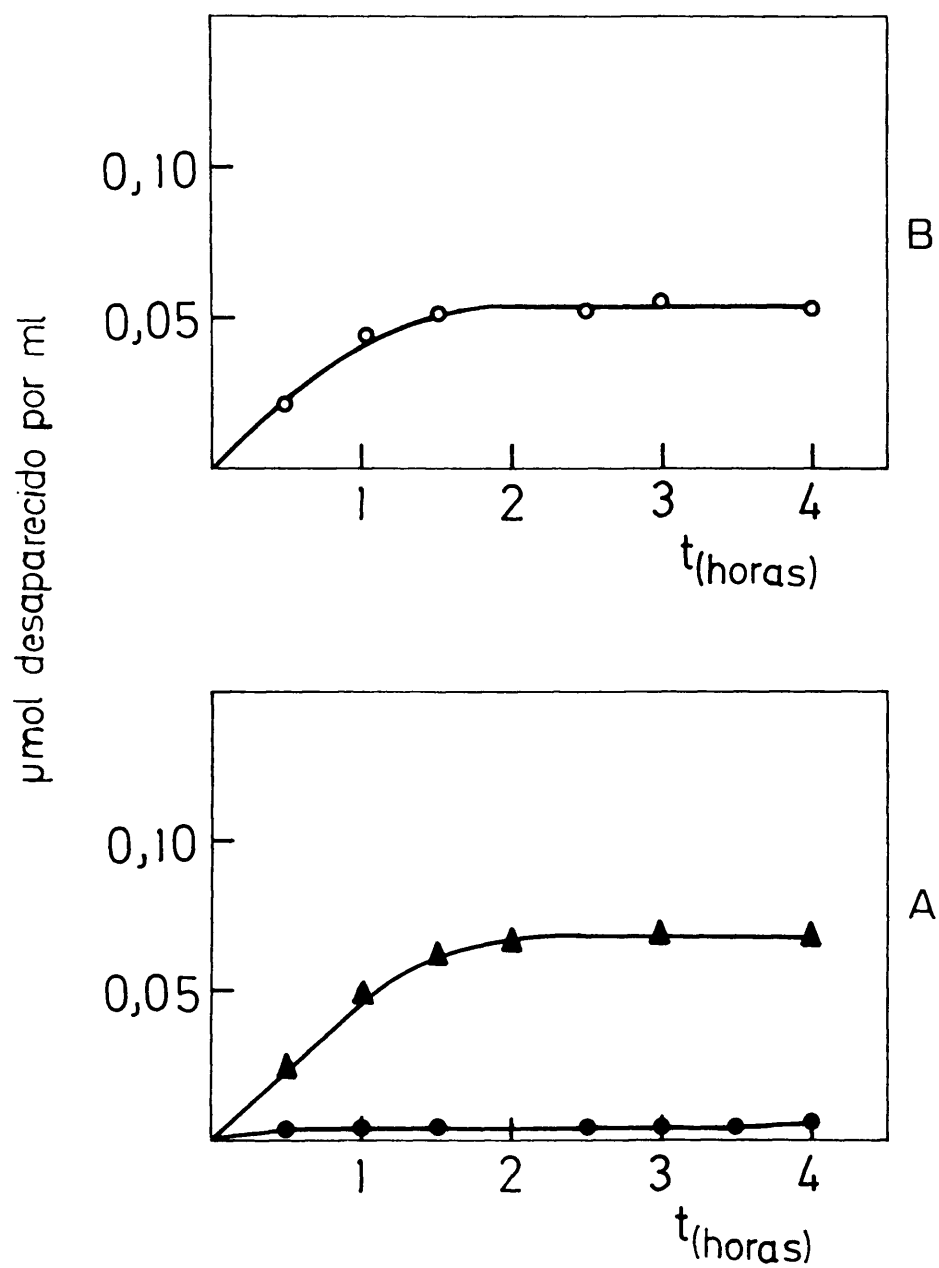


FIGURA 15. Transformación enzimática de glioxilato y propionil-CoA a través de la reacción α -hidroxiglutarato sintasa. A: en presencia de ambos sustratos ($-\blacktriangle-$ propionil-CoA, $-\bullet-$ glioxilato); B: en ausencia de glioxilato ($-\bullet-$ propionil-CoA).

cida en propionato, contrariamente a lo que sucede en E. coli E-26 (Reeves y Ajl, 1962; Reeves y col., 1963; Rabin y col., 1965), en el proceso de adaptación a propionato de la misma especie bacteriana (Wegener, Reeves y Ajl, 1968a y b) y en E. coli K₁₂ cepas K_I y K_{II} (Kay, 1972).

La lenta desaparición del propionil-CoA puede atribuirse a la presencia en los extractos de una desacilasa o hidrolasa que ha sido descrita en Moraxella (Hodgson y McGarry, 1968b) y en tejidos animales (Mahler, 1962).

IV.6.2.2. Actividades α -hidroxiglutarato descarboxilasa y semialdehído succínico deshidrogenasa

Las actividades de estas enzimas han sido determinadas según se describe en las Secciones III.2.11.3. y III.2.11.4. Los resultados se muestran en la Tabla XXV, donde se comparan los obtenidos en extractos de S. typhimurium y E. coli B crecidas en diferentes sustratos.

En todos los casos estudiados, la actividad α -hidroxiglutarato descarboxilasa ha resultado ser cero ó próxima a cero, mientras la de la semialdehído succínico deshidrogenasa mostró unos valores muy bajos para células de E. coli B y S. typhimurium, crecidas en propionato y succinato, sobre todo cuando se comparan con las de las

TABLA XXV. Actividades específicas de α -hidroxiglutarato descarboxilasa y semialdehído succínico deshidrogenasa en extractos de S. typhimurium LT2 y E. coli cepa B.

ORGANISMO	SUSTRATO DE CRECIMIENTO	α -hidroxiglutarato descarboxilasa. $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$	Semialdehído succínico deshidrogenasa. $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$	
			NAD	NADP
<u>S. typhimurium</u> LT2	Propionato	0,001	0,015	0,028
	Succinato	0,000	0,022	0,032
<u>E. coli</u> B	Propionato	0,001	0,028	0,041
	Succinato	0,002	0,025	0,038
	p-hidroxifenilacético	0,000	0,180	0,105
	γ -aminobutirato + succinato	0,000	0,319	0,034

Los ensayos se realizaron según se describe en las secciones III.2.11.3 y III.2.11.4. Los datos expresados se refieren a actividades específicas y son media de 2-3 determinaciones.

células de E. coli crecidas en γ -aminobutirato y p-hidroxifenilacetato, donde la enzima resulta esencial en las rutas degradativas correspondientes de estos compuestos (Donnelly y Cooper, 1981b).

IV. 6.3. Actividad α -hidroxiglutarato liasa

La α -hidroxiglutarato liasa cataliza la reacción de escisión del α -hidroxiglutarato en acetato y lactato. Esta reacción es una ruta alternativa a la del α -hidroxiglutarato anteriormente descrita. La presencia de esta enzima en el metabolismo del propionato ha sido descrita en Aspergillus glaucus, Pseudomonas aeruginosa, P. fluorescens, Penicillium (Richards y Lloyd, 1966) y en E. coli E-26 (Reeves y Ajl, 1963; Megraw y col., 1965a y b). Aunque en Salmonella no se ha encontrado actividad α -hidroxiglutarato sintasa (Sección IV. 6.2.1.), la α -hidroxiglutarato liasa ha sido analizada para confirmar que el α -hidroxiglutarato no se encuentra implicado en la ruta degradativa del propionato de esta bacteria.

En la Tabla XXVI se muestra que tanto las células crecidas en acetato como en propionato no presentan actividad α -hidroxiglutarato liasa.

TABLA XXVI. Actividad α -hidroxiglutarato liasa en extractos celulares de S. typhimurium LT2 crecida en acetato y propionato

SUSTRATO DE CRECIMIENTO	EXTRACTOS	ACTIVIDAD ESPECIFICA (μmol lactato formado $\text{mg}^{-1} \text{min}^{-1}$)	
		1 hora	2 horas
ACETATO	Extractos crudos	0'017	0'015
	Extractos hervidos	0'012	0'013
PROPIONATO	Extractos crudos	0'020	0'021
	Extractos hervidos	0'010	0'015

Los ensayos de actividad se realizaron según el método descrito en la Sección III. 2.11.5.

Los resultados expresados son la media aritmética de tres determinaciones.

IV. 6.4. Actividades de las enzimas del ciclo del glioxilato

El ciclo del glioxilato, esencial cuando las bacterias utilizan acetato como fuente de carbono y energía, ha sido descrito que se encuentra implicado en el metabolismo del propionato por algunos autores; así en Moraxella lwoffii (Hodgson y McGarry, 1968a y b), E. coli K₁₂ cepas K_I y K_{II} (Kay, 1972), E. coli E-26 y K₁₂ (Wegener y col., 1969), Prototheca zopfii (Callely y Lloyd, 1964; Lloyd y Callely, 1965), Aspergillus glaucus, Pseudomonas aeruginosa, P. fluorescens y Penicillium (Richards y Lloyd, 1966) E. coli E-26 (Reeves y Ajl, 1963; Rabin y col., 1965; Megraw y col., 1965a y b; Reeves y col., 1965; Wegener, Reeves y Ajl, 1968a y b).

Asimismo, Wegener y col. (1969) proponen que el piruvato formado en el metabolismo de propionato de E. coli E-26 y K₁₂ puede ser oxidado a acetato por medio de la piruvato deshidrogenasa y este metabolito, a través de la isocitrato liasa y de la malato sintasa, proporcionar una vía operativa anaplerótica al ciclo de Krebs.

IV. 6.4.1. Actividad isocitrato liasa

En Salmonella typhimurium el catabolismo del acetato y del propionato parece encontrarse muy relacionado ya que ambos sustratos son transportados por el mismo sistema, además en los diversos ensayos mutagénicos realizados los mutantes acet⁻prp⁻ aparecen con alta frecuencia y finalmente algunos revertientes lact⁺ de mutantes pps⁻ muestran actividad isocitrato liasa constitutiva.

En la Tabla XXVII se expresan las actividades específicas de la isocitrato liasa determinadas en diferentes sustratos y tres fases de crecimiento de S. typhimurium LT2, E. coli cepa B y E. coli K₁₂ cepa X₂₈₉. Se puede observar, que salvo en el crecimiento sobre acetato y glioxilato, cuyos niveles son semejantes a los obtenidos por otros autores (Reeves y Ajl, 1960; Kornberg, 1963; Asworth y Kornberg, 1963 y 1964; Vanderwinkel y Vlieghe, 1968; Hodgson y McGarry, 1968a y b; Kay, 1972), el resto de los valores de actividad son muy próximos a cero. Algunos investigadores han indicado que la actividad isocitrato liasa tiene gran importancia según la fase de crecimiento. Así Wegener, Reeves y Ajl (1968a y b) y Wegener y col. (1967, 1968b, 1969) propugnan que la acción de esta enzima proporciona un mecanismo auxiliar para la formación de intermediarios C₄, en el periodo de adaptación del crecimiento.

TABLA XXVII. Actividad isocitrato liasa en S. typhimurium LT2 y E. coli cepa B y K₁₂ X₂₈₉ en distintos sustratos y fases de crecimiento

ORGANISMO	SUSTRATO	ACTIVIDAD ESPECIFICA ($\mu\text{mol glioxilato/mg/min}$) $\times 10^{-3}$		
		Fase logarítmica		Fase estacionaria
		1ª Mitad	2ª Mitad	
<u>S. typhimurium</u> LT2	Glucosa	0	0	0
	Glicerol	-	1	1
	Succinato	0	0	-
	Citrato	2	10	-
	Piruvato	8	10	6
	Lactato	4	5	0
	Acetato	171	205	174
	Propionato	1	3	4
<u>E. coli</u> B	Acetato	137	163	-
	Propionato	-	3	0
<u>E. coli</u> K ₁₂ cepa X ₂₈₉	Glioxilato	340	-	-
	Acetato	185	280	-
	Propionato	6	-	60

Los ensayos enzimáticos se realizaron por los métodos descritos en la Sección III. 2.11.5.

Los valores expresados son la media aritmética de 2-3 determinaciones.

to sobre propionato y en la fase estacionaria de E. coli. Por otra parte, Hodgson y McGarry (1968a y b) en Moraxella lwofii, Callely y Lloyd (1964) y Lloyd y Callely (1965) en Prototheca zopfii y Kay (1972) de E. coli K₁₂ cepas K_I y K_{II} describen que esta enzima es necesaria a lo largo del crecimiento de estas especies sobre propionato. Sin embargo, los resultados obtenidos en Salmonella permiten asignar a la isocitrato liasa poca importancia en el crecimiento sobre propionato.

Para confirmar esta susposición, conociendo el papel inhibidor del PEP sobre la isocitrato liasa (Ashworth y Kornberg, 1963) y el hecho de que alguno de los revertientes lact⁺ de mutantes pps⁻ son isocitrato liasa constitutivos (Sección IV. 5.3.), se determinaron los niveles de actividad de esta enzima en los distintos revertientes, procedentes de mutantes pps⁻. Los resultados se muestran en la Tabla XXVIII donde se puede apreciar que los revertientes prp⁺ de AG 517 que recuperan la capacidad de crecer sobre lactato, piruvato y propionato, son isocitrato liasa constitutivos. Los revertientes acet⁺ únicamente recuperan el crecimiento en acetato siendo isocitrato liasa inducibles. Sin embargo, los revertientes lact⁺ carecen de dicha actividad, posiblemente por el efecto de represión del PEP formado constitutivamente sobre ella. Estos hechos sugieren que en Salmonella el propionato no parece

TABLA XXVIII. Actividades isocitrato liasa en revertientes de mutantes pps^- de S. typhimurium

ORGANISMO	SUSTRATO	ACTIVIDAD ESPECIFICA ($\mu\text{mol glioxilato/mg/min}$) $\times 10^{-3}$
<u>S. typhimurium</u> LT2	Acetato	190
	Glicerol	1
Rev. AA 306 <u>prp</u> ⁺	Glicerol + Timina	68
Rev. AA 306 <u>lact</u> ⁺	Glicerol + Timina	120
Rev. AG 517 <u>prp</u> ⁺	Glicerol	200
Rev. AG 517 <u>lact</u> ⁺	Glicerol	3
	Acetato	5
Rev. AG 517 <u>acet</u> ⁺	Glicerol	7
	Acetato	140
Rev. A ₁ <u>lact</u> ⁺	Glicerol + Leucina	5
Rev. A ₁ <u>prp</u> ⁺ (G2)	Propionato	100
Rev. 4017 <u>lact</u> ⁺ pequeñas	Glicerol + Leucina	6
	Acetato	0
Rev. 4017 <u>lact</u> ⁺ grandes	Glicerol + Leucina	0
	Acetato + Leucina	0

Los ensayos enzimáticos se realizaron por los métodos descritos en la Sección III. 2.11.5.

Los valores expresados son la media aritmética de 2 determinaciones.

inducir la isocitrato liasa.

Los resultados obtenidos con A_1 \underline{prp}^+ confirman que la actividad isocitrato liasa constitutiva revierte el fenotipo \underline{pps}^- , ganándose asimismo la capacidad de crecer en propionato. Por otra parte, los revertientes AA 306 \underline{prp}^+ y \underline{lact}^+ , procedentes del mutante AA 306 $\underline{lact}^- \underline{pir}^- \underline{prp}^-$ y que han recuperado la capacidad de crecer en estos sustratos, se comportan como los Ag 517 \underline{prp}^+ , mostrando actividad isocitrato liasa constitutiva. Sin embargo, los revertientes 4017 \underline{lact}^+ (colonias grandes) aunque recuperen el fenotipo silvestre carecen de actividad isocitrato liasa, es decir, se comportan de forma similar a los AG517 \underline{lact}^+ .

De forma general, apoyándonos en estos datos, se puede aseverar que el metabolismo del propionato en Salmonella, la isocitrato liasa presenta un valor poco significativo, y que en condiciones de constitutividad puede estar implicada en el catabolismo de dicho compuesto.

IV. 6.4.2. Actividad malato sintasa

La actividad malato sintasa ha sido determinada por ser juntamente con la isocitrato liasa enzima clave del ciclo del glioxilato. Dicha determinación puede servir

para confirmar que la operatividad de dicho ciclo es escasa o nula en el metabolismo del propionato.

En la Tabla XXIX se observa, tal como se esperaba, que la actividad malato sintasa únicamente presenta valores altos cuando el acetato es la fuente de carbono. Aquellos autores que encuentran significativamente importante el ciclo del glioxilato para el metabolismo del propionato describen valores de actividad de esta enzima semejantes a los obtenidos cuando crece en acetato.

En el metabolismo del propionato, las actividades isocitrato liasa y malato sintasa juegan un papel esencial en aquellas rutas que implican el α -hidroxiglutarato y en algunas que conducen a acetato bien a través del α -hidroxiglutarato o del acrilato. Así Reeves y Ajl (1962) y Reeves y col. (1963) describen la existencia de una enzima condensante de glioxilato y propionil-CoA en E. coli E-26 que denominaron α -hidroxiglutarato sintasa y Reeves y col. (1965) demuestran la formación de semialdehído succínico. En la misma especie bacteriana, Rabin y col. (1965) propugnan la transformación del α -hidroxiglutarato a succinato, en el proceso de adaptación a propionato. Posteriormente en E. coli K₁₂ y W, Wegener y col. (1967, 1968b, 1969), Wegener, Reeves y Ajl (1968a y b), Weeks y col. (1969), Salanitro y Wegener (1971) confirman la existencia

TABLA XXIX. Actividad malato sintasa en células de S. typhimurium LT2 en diferentes sustratos y fases de crecimiento

SUSTRATO	Actividad específica ($\mu\text{mol/mg/min}$) $\times 10^{-3}$		
	Fase logarítmica		Fase estacionaria
	1ª Mitad	2ª Mitad	
Glucosa	23	8	11
Succinato	10	-	20
Citrato	25	29	-
Lactato	0	1	2
Piruvato	17	15	-
Acetato	206	196	-
Propionato	0	1	1
Propionato + Y	0	2	1

Los ensayos enzimáticos se realizaron por el método descrito en la Sección III. 2.11.6.

Los valores expresados son la media aritmética de 2-3 determinaciones.

de esta ruta en cepas silvestres y mutantes que han ganado la capacidad de crecer en propionato, aunque Kay (1972) indica que esta ruta es alternativa con la del acrilato.

La existencia de α -hidroxiglutarato liasa descrita por Reeves y Ajl (1963) en E. coli E-26 sugirió la existencia de otra ruta en el catabolismo del propionato. Más tarde, Reeves y Ajl (1965a y b), Rabin y col. (1965), Megraw y col. (1965a y b) en la misma especie demostraron la operatividad de dicha ruta conducente a una molécula de acetato y una molécula de 1,3 difosfoglicerato ó dos de acetato. Richards y Lloyd (1966) confirman la operatividad de esta ruta en extractos celulares de Aspergillus glaucus.

Sin embargo, en S. typhimurium no se ha detectado actividad isocitrato liasa, malato sintasa, α -hidroxiglutarato sintasa ó liasa ni en la adaptación ni a lo largo del crecimiento sobre propionato. Esto es un índice claro de que las rutas del α -hidroxiglutarato no están implicadas en el metabolismo del propionato en esta bacteria. En E. coli K₁₂ y E-26 (Wegener y col. 1969) sugieren que el acetil-CoA en lugar de condensarse con OAA se incorpora al ciclo del glioxilato. Pero éste no parece ser el destino del posible acetil-CoA que se forme en Salmonella cuando crece en propionato, ya que como se ha indicado las actividades de la isocitrato liasa y malato sintasa son muy próximas a cero.

IV. 6.5. Actividad propionil-CoA deshidrogenasa

La determinación de la actividad propionil-CoA deshidrogenasa planteó una problemática difícil de superar. En principio se intentó analizar la actividad utilizando como cofactores NAD ó NADP y mezclas de reacción a diferentes pH (Sección III. 2.11.8.3.) obteniéndose resultados negativos. Posteriormente, pensando que la enzima fuera dependiente de nucleótidos de flavina, se utilizaron compuestos aceptores de electrones. En estos casos, la actividad de la enzima fue determinada según la técnica de Callely y Lloyd (Sección III.2.11.8.1.) en células de Salmonella typhimurium crecidas en glucosa, succinato, citrato, lactato, piruvato, acetato, glicerol ó propionato. Aunque el nivel de actividad de la enzima fue mayor en células crecidas en propionato que en el resto de los sustratos, los datos no proporcionaron una información suficientemente convincente que permitieran afirmar la operatividad de esta enzima.

Con objeto de incrementar la sensibilidad del ensayo, se añadió a la mezcla de reacción PMS y se utilizaron diferentes tampones y pH. De la Tabla XXX se desprende que la mayor actividad se obtiene a pH 7'5 en tampón fosfato. Los ensayos se repitieron en presencia de cationes bivalentes, comprobándose que la enzima parece no requerir

TABLA XXX. Actividad propionil-CoA deshidrogenasa de *S. typhimurium* LT2, crecida en propionato, en diferentes tampones y pH

TAMPONES	pH	ACTIVIDAD ESPECIFICA (μmol sustrato transformado $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$) $\times 10^{-3}$
Tris-HCl	7'1	81'0
	7'5	116'2
	8'0	131'2
Fosfato potásico	6'0	105'0
	6'5	125'6
	7'0	170'0
	7'5	181'0
	8'0	147'7

Los ensayos se realizaron según el método descrito en la Sección III. 2.11.8.1.

Los datos expresados son la media aritmética de cuatro determinaciones.

caciones para su actividad.

La actividad propionil-CoA deshidrogenasa fue determinada en células crecidas en diferentes sustratos, utilizando tampón fosfato pH 7.5 y PMS. De los resultados que se muestran en la Tabla XXXI, se puede fácilmente observar que la actividad de la enzima en células crecidas en propionato es únicamente dos veces superior a las crecidas en otros sustratos.

Posteriormente, el aceptor de electrones, DCPIP, fue sustituido en la mezcla de reacción por el DTNB, que actúa reaccionando con los grupos sulfidrilo libres, para comprobar si el propionil-CoA fuera también sustrato de una hidrolasa, cuya presencia ya se ha mencionado en Moraxella (Hodgson y McGarry, 1968b) y en tejidos animales en la beta-oxidación de ácidos grasos (Mahler, 1962; Beinert, 1962; Hall y col., 1979). Este hecho podría ser la causa de la baja actividad deshidrogenásica detectada en los extractos crudos de S. typhimurium.

Se observa en la Tabla XXXII que con propionil-CoA como sustrato, el valor que se obtiene con DTNB es casi la mitad del que se obtiene con acetil-CoA y con CoA, mientras que con el DCPIP el valor obtenido con propionil-CoA es superior al del resto de los sustratos de reacción

TABLA XXXI. Actividad propionil-CoA deshidrogenasa en S. typhimurium LT2 crecida en diferentes sustratos

SUSTRATO DE CRECIMIENTO	ACTIVIDAD ESPECIFICA ($\mu\text{mol propionil-CoA reducido}$ $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$) $\times 10^{-3}$
Glucosa	106
Succinato	106
Glicerol	118
Lactato	130
Acetato	100
Propionato	205

Los ensayos se realizaron según se ha descrito en la Sección III. 2.11.8.2.

Los resultados expresados son la media aritmética de tres determinaciones.

TABLA XXXII. Actividades propionil-CoA deshidrogenasa de S. typhimurium LT2 utilizando DTNB ó DCPIP y distintos sustratos de reacción

SUSTRATO DE REACCION	REACTIVO UTILIZADO	
	DTNB	DCPIP
Acetil-CoA	0'460	0'065
Propionil-CoA	0'280	0'200
CoA-SH	0'500	0'150
Propionato	0'000	0'000
Propionato + ATP	0'000	0'000
Propionato + ATP + CoA	0'400	0'180
Acrilil-CoA	-	0'020

Los ensayos se realizaron según se ha descrito en la Sección III. 2.11.8.2.

Los datos expresados se refieren a actividades específicas y son la media aritmética de dos determinaciones.

ensayados. De estos datos se puede deducir la presencia de una enzima que utilizará el propionil-CoA y el acetil-CoA como sustratos para originar CoA libre.

A partir de estos ensayos se tomó como criterio que la actividad propionil-CoA deshidrogenasa corresponde a la diferencia existente entre los valores de la reacción que utiliza propionil-CoA y acetil-CoA como sustratos y el DCPIP como reactivo.

Con objeto de conocer si la deshidrogenasa y/o la hidrolasa se encuentran unidas a membrana, se realizaron ensayos con células sometidas a choque osmótico (según la técnica descrita en la Sección III. 2.10.). En la disolución que contiene las enzimas periplásmicas no se encontró actividad de ninguna de las dos enzimas.

Posteriormente, los extractos celulares de S. typhimurium, crecida en propionato, se sometieron a fraccionamiento con sulfato amónico y cromatografía sobre geles de filtración, con objeto de separar las actividades propionil-CoA deshidrogenasa e hidrolasa.

En la Tabla XXXIII aparece resumido el proceso de fraccionamiento. Se observa que las actividades de ambas enzimas, que corresponden a una precipitación entre

0 y 50% de saturación de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, se encuentran juntas en las etapas II y III de dicho proceso. Posteriormente, las fracciones con actividad se aplicaron a una columna de filtración en gel (Sephacryl S-200). El perfil del eluido correspondiente a la proteína medida espectrofotométricamente a 280 nm aparece en la Figura 16. Asimismo, se puede observar que las actividades de ambas enzimas permanecen juntas en las mismas fracciones.

Como el tamaño molecular de ambas enzimas parece ser muy semejante, se intentó la separación de las enzimas confiando que su estabilidad frente al calor y/o sus puntos isoeléctricos fueran diferentes. Para ello los extractos celulares se sometieron a tratamiento térmico y después de centrifugar, el sobrenadante se aplicó a una columna de intercambio iónico (DEAE Sephacel). En la Tabla XXXIV se observa que la actividad correspondiente a la hidrolasa se reduce en un 80% después del calentamiento de los extractos a 50°C 5 minutos, y en la Figura 17, correspondiente al proceso de elución de la columna de intercambio iónico, que la actividad de la propionil-CoA deshidrogenasa se encuentra comprendida entre los tubos 33, 34 y 35, que corresponden a una concentración de NaCl 0'40 M - 0'45 M.

Basándose en estos últimos ensayos enzimáticos

TABLA XXXIII. Actividad propionil-CoA deshidrogenasa e hidrolasa en el proceso de fraccionamiento con sulfato amónico

	SUSTRATO DE REACCION		
Etapa de fraccionamiento	Propionil-CoA	Acetil-CoA	Acrilil-CoA
I. Extractos crudos	23'0*	12'0	0'1
II. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0-30%)	3'0	2'0	0'0
III. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (30-50%)	20'5	9'8	0'0
IV. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (50-90%)	0'0	0'0	0'0

* Los datos se expresan en Unidades Internacionales totales. La reacción se llevó a cabo utilizando como reactivo DCPIP.

La actividad hidrolásica corresponde a la actividad que se obtiene cuando se utiliza acetil-CoA como sustrato. La deshidrogenásica se toma como la diferencia entre la actividad obtenida con propionil-CoA y acetil-CoA.

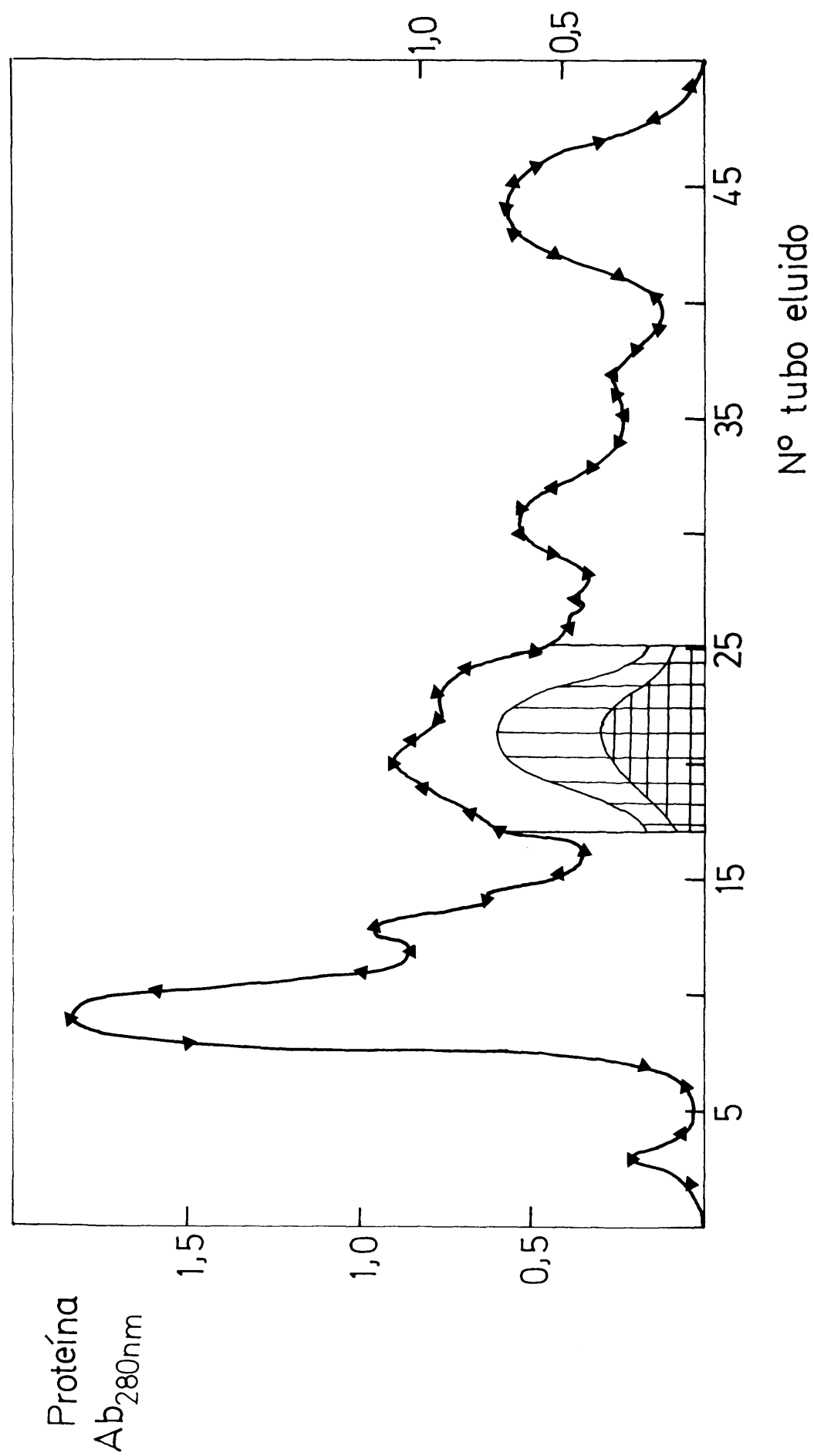


FIGURA 16. Perfil de eluido de la columna de cromatografía de filtración en gel correspondiente a la fracción precipitada con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0-50%): Ab_{280nm} (-▲-), actividad con propionil-CoA como sustrato (||||), actividad con acetil-CoA como sustrato (##).

TABLA XXXIV. Actividades deshidrogenásica e hidrolásica en extractos celulares de S. typhimurium tratados térmicamente

	DTNB	DCPIP	
Extractos	Propionil-CoA	Propionil-CoA	Acetil-CoA
Crudos	0'660*	0'435	0'235
Calentados 5 min 50°C	0'066	0'168	0'035
Calentados 15 min 50°C	0'060	0'150	0'015
Calentados 30 min 50°C	0'020	0'100	0'010
Calentados 45 min 50°C	0'010	0'080	0'010
Calentados 90 min 50°C	0'010	0'080	0'010

* Los datos están expresados en U/ml.

La actividad hidrolásica corresponde a la actividad que se obtiene cuando se utiliza acetil-CoA como sustrato. La deshidrogenásica se toma como la diferencia entre la actividad obtenida con propionil-CoA y acetil-CoA.

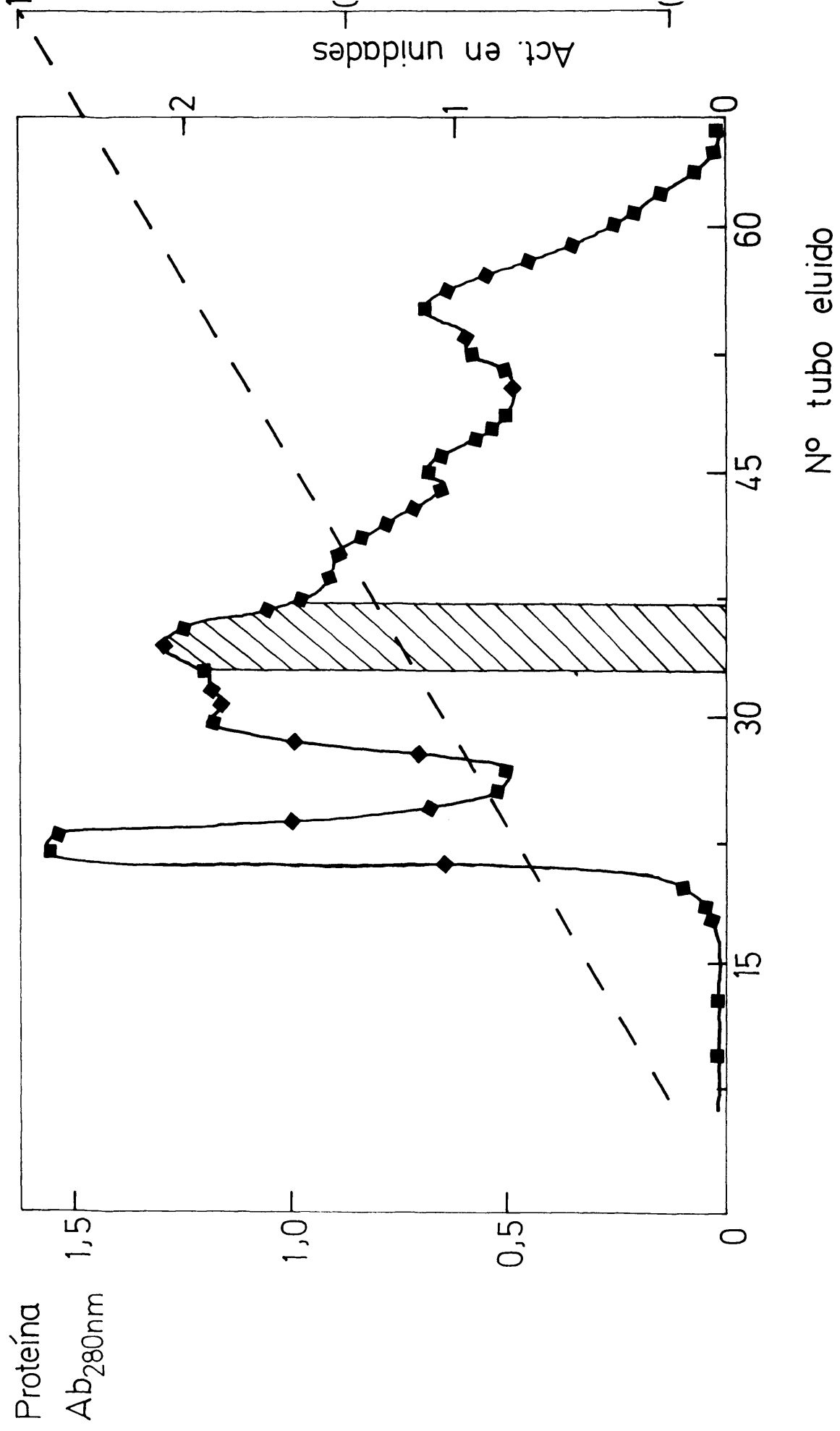


FIGURA 17. Perfil de eluido de la columna de cromatografía de intercambio iónico correspondiente a extractos tratados térmicamente: Ab_{280nm} (—■—), actividad con propionil-CoA como sustrato (///).

se podría considerar la presencia de la propionil-CoA deshidrogenasa en extractos de Salmonella, crecida sobre propionato, sin embargo la existencia de la hidrolasa y el hecho de que esta enzima sea la primera de la ruta del acrilato nos llevó a intentar confirmar su actividad determinando la concentración del producto de la reacción utilizando cromatografía de HPLC. Métodos de ensayo basados en la detección del producto de reacción de esta enzima por medio de radioactividad y cromatografía en capa fina han sido descritos por Wegener, Reeves y Ajl (1967a y b) y Baldwin y col. (1965) respectivamente.

La técnica descrita en la Sección III.2.11.8.4. fue puesta a punto utilizando diversos eluyentes hasta conseguir unas condiciones y resolución adecuadas, que permitieron identificar y cuantificar los acilos de CoA.

En la Figura 18 se muestra el cromatograma correspondiente a la mezcla de acrilil-CoA, propionil-CoA, acetil-CoA (Sección III.2.13.2.1.) y en las Figuras 19, 20, 21 y 22, los correspondientes a estas mismas sustancias en células crecidas en diferentes sustratos con el fin de determinar la concentración endógena de estos acil-CoA derivados (Sección III.2.13.2.3.).

En las Figuras 23a, 23b y 23c se muestra el per-

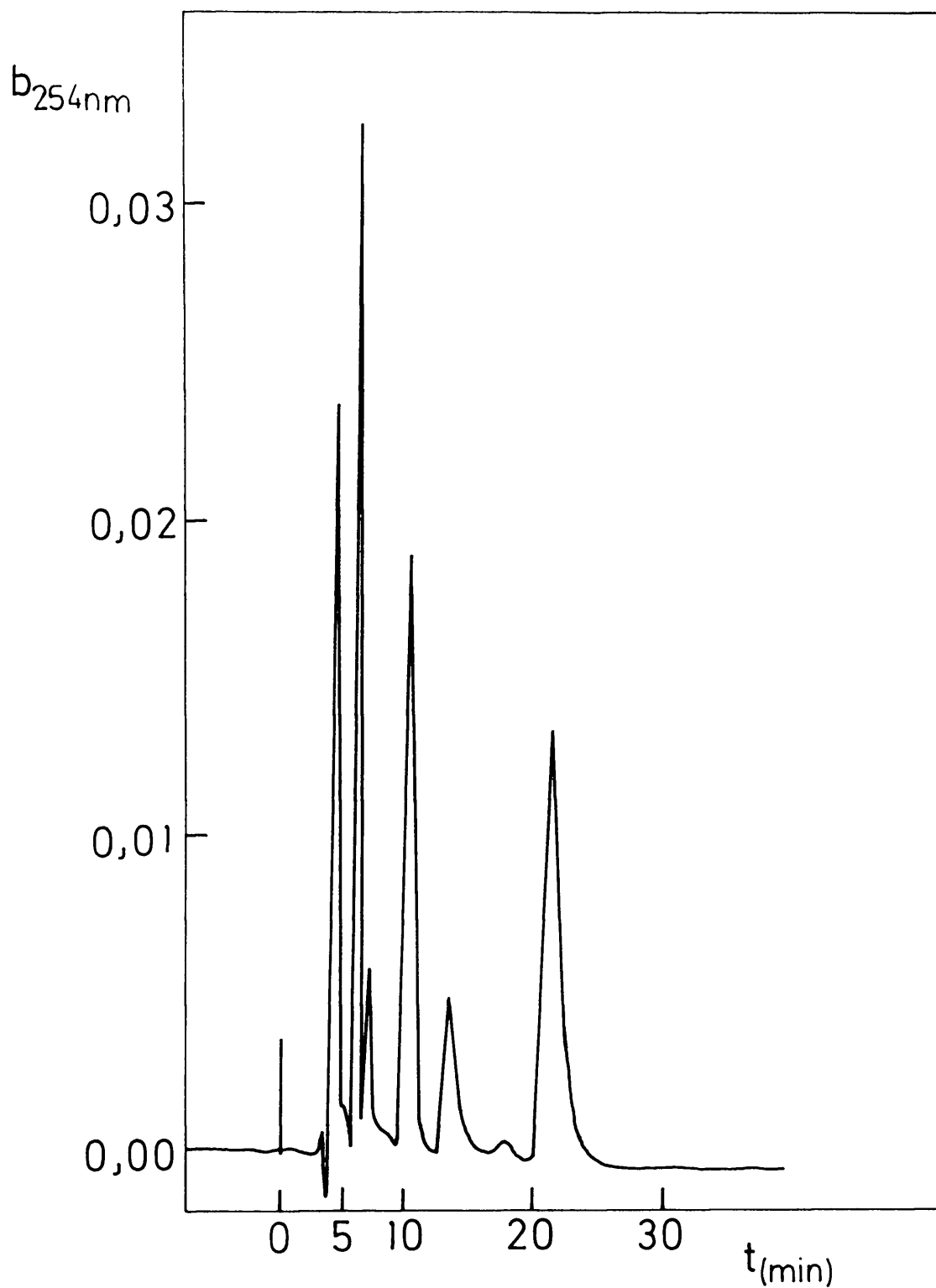


FIGURA 18. Cromatograma de la mezcla patrón de CoA y acilos de CoA. Las concentraciones y tiempos de elución han sido: acrilil-CoA, 0'272 μ mol, 4 y 6'5 min; CoA, 0'180 μ mol, 5'5 y 12 min; acetil-CoA, 0'272 μ mol, 9 min y propionil-CoA, 0'272 μ mol, 20 min. El eluyente fue tampón fosfato 0'220 M pH 4'0, 20% de metanol y 0'05% de tiodiglicol.

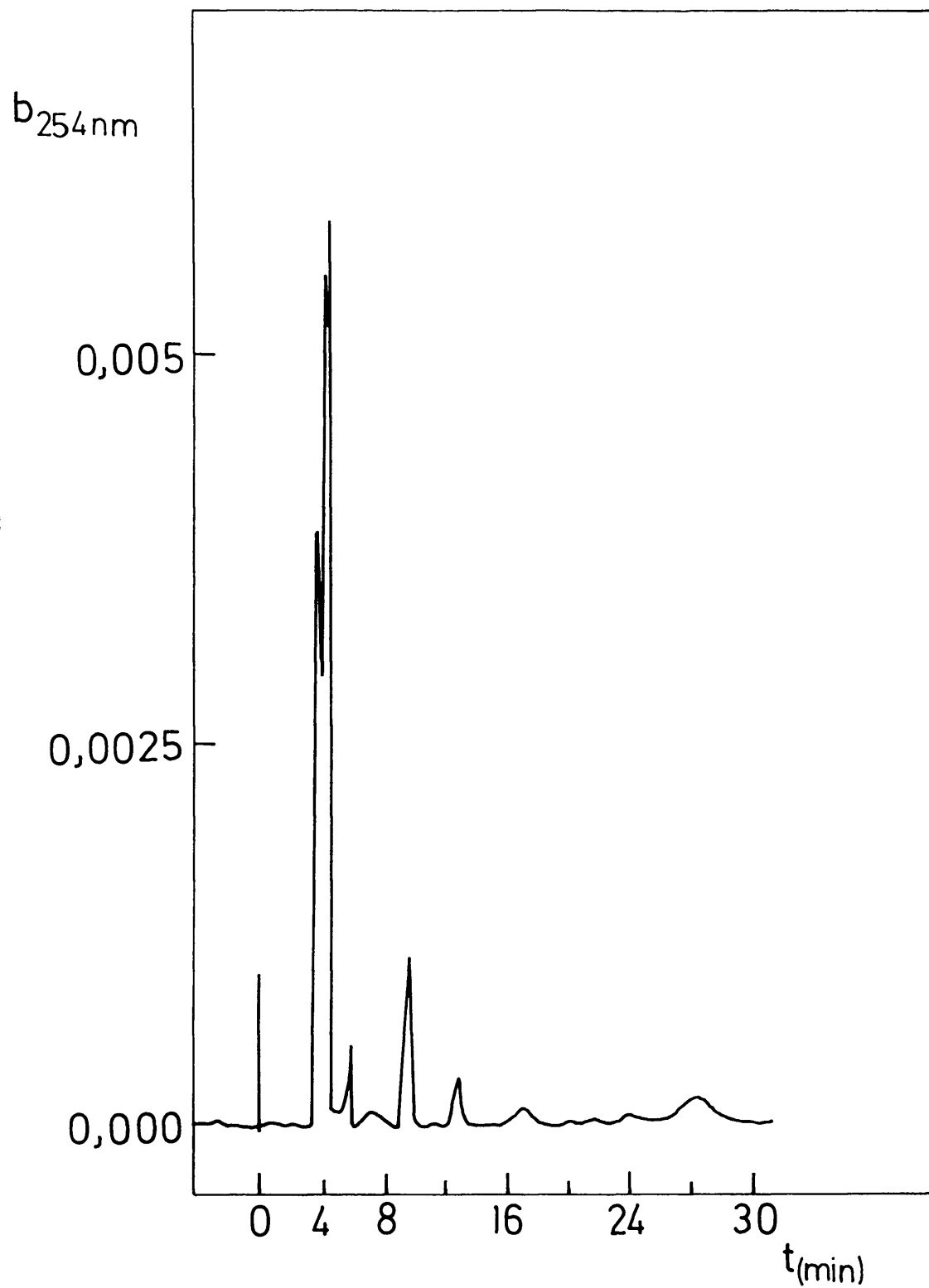


FIGURA 19. Cromatograma de elución de propionil-CoA, acetil-CoA, acrilil-CoA y CoA libre endógenos en células de Salmonella typhimurium, crecidas sobre glucosa. El eluyente fue tampón fosfato 0'22 M pH 4'0, 20% de metanol y 0'05% de tiodiglicol.

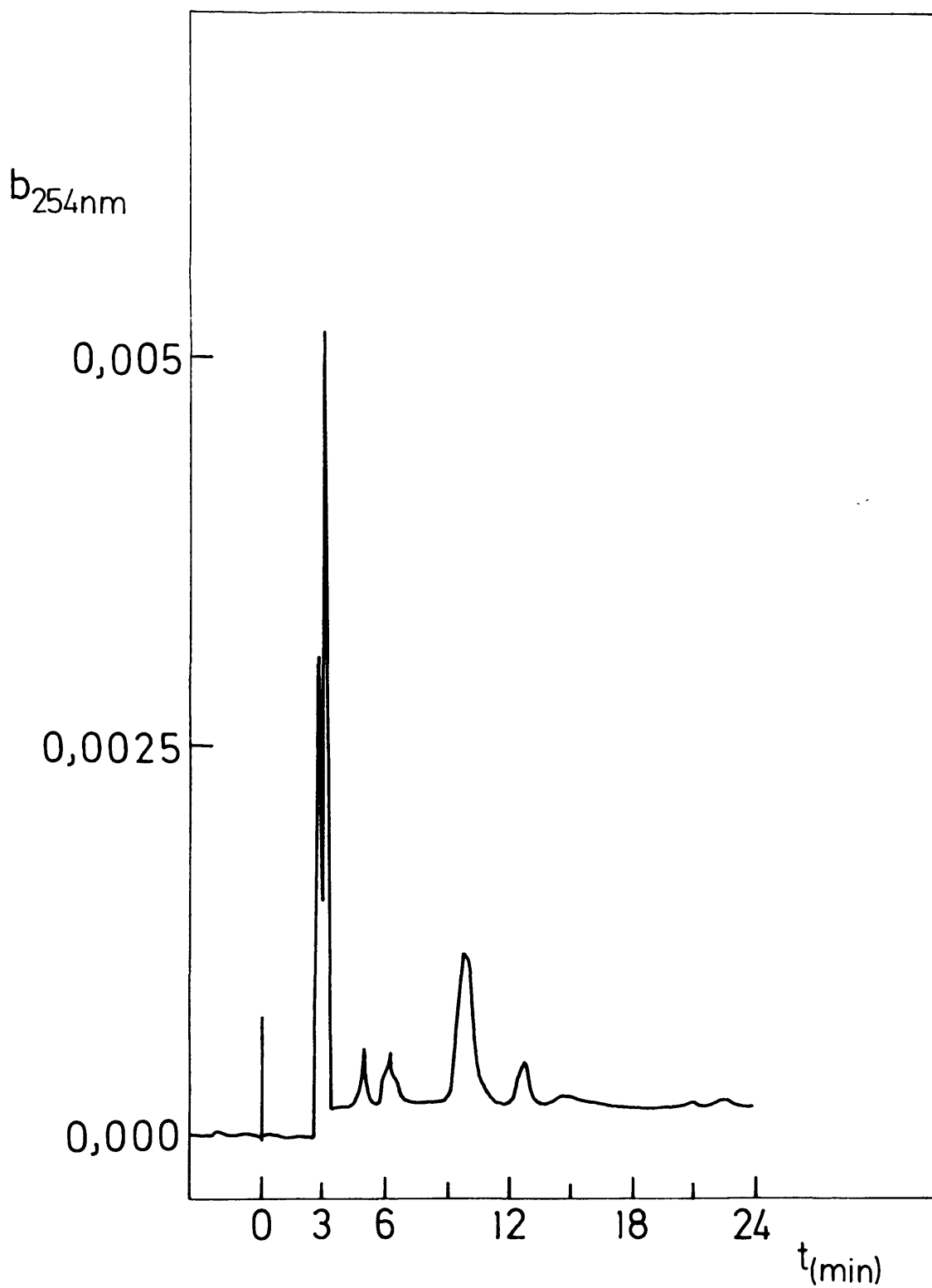


FIGURA 20. Cromatograma de elución de propionil-CoA, acetil-CoA, acrilil-CoA y CoA libre endógenos en células de Salmonella typhimurium, crecidas sobre acetato. El eluyente fue tampón fosfato 0'22 M pH 4'0, 20% de metanol y 0'05% de tiodiglicol.

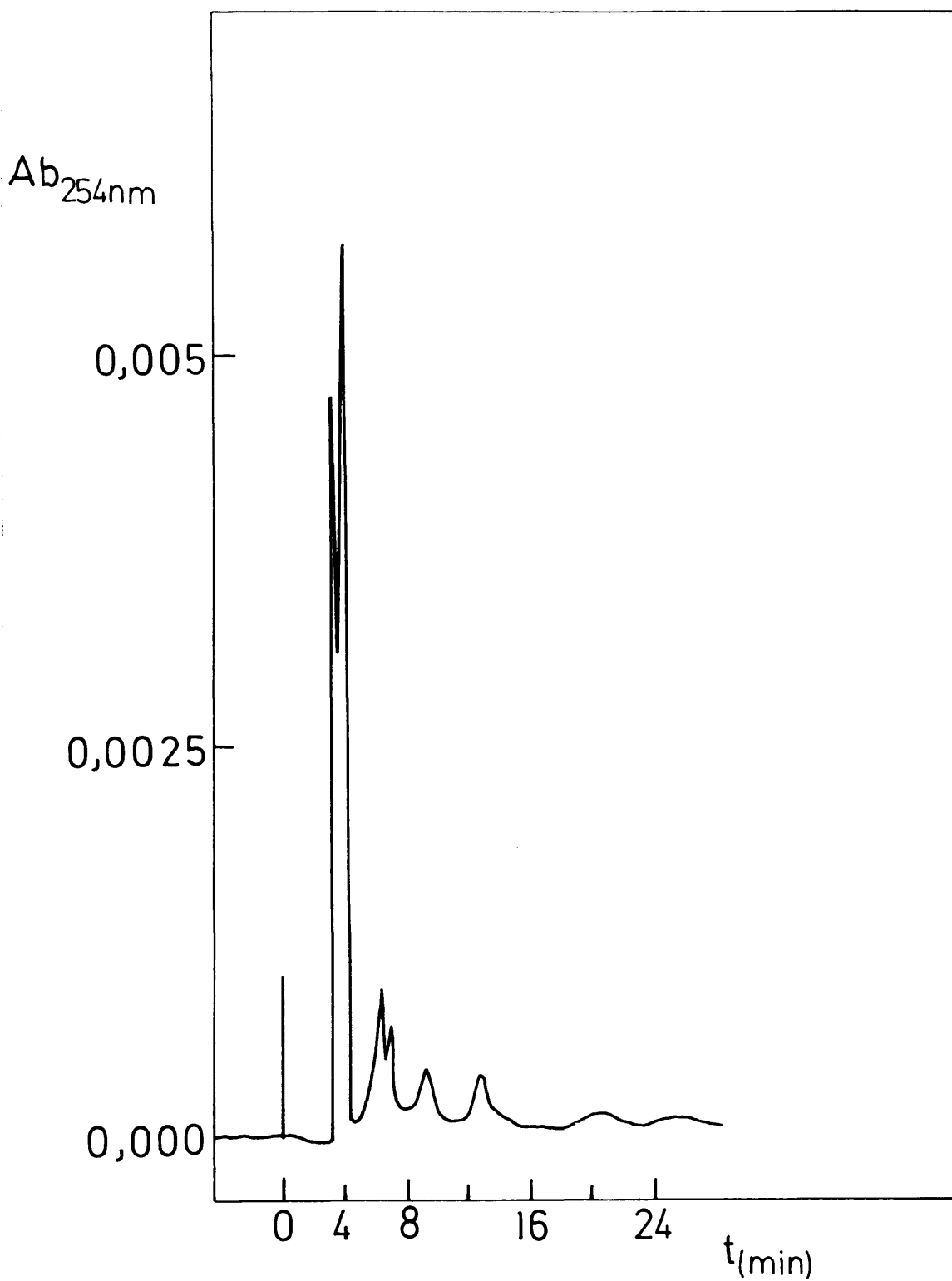


FIGURA 21. Cromatograma de elución de propionil-CoA, acetil-CoA, acrilil-CoA y CoA libre endógenos en células de Salmonella typhimurium, crecidas sobre lactato. El eluyente fue tampón fosfato 0'22 M pH 4'0, 20% de metanol y 0'05% de tiodiglicol.

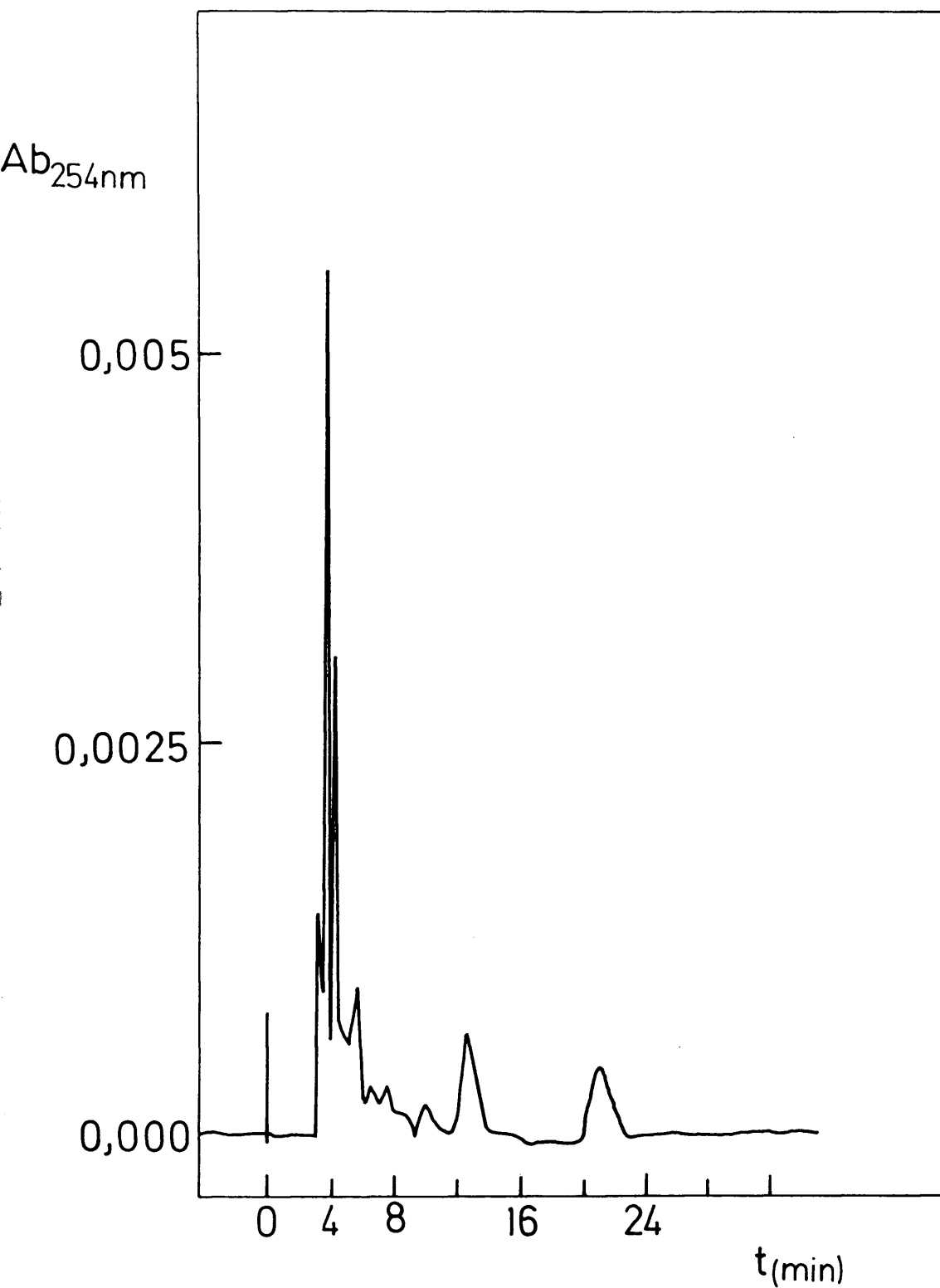


FIGURA 22. Cromatograma de elución de propionil-CoA, acetil-CoA, acrilil-CoA y CoA libre endógenos en células de Salmonella typhimurium, crecidas sobre propionato. El eluyente fue tampón fosfato 0'22 M pH 4'0, 20% de metanol y 0'05% de tiodiglicol.

fil de elución que corresponde a la reacción de la propionil-CoA deshidrogenasa a 0, 10 y 30 minutos, respectivamente (Sección III. 2.13.2.2.). Del examen de estos cromatogramas se observa que, a medida que la reacción transcurre, la concentración de propionil-CoA decrece y aumenta la de acrilil-CoA, apareciendo, simultáneamente, CoA libre. Estos resultados confirman, en los extractos celulares de S. typhimurium, crecida en propionato, la presencia de actividad propionil-CoA deshidrogenasa y de hidrolasa, la cual escinde los acil-CoA en sus componentes.

La presencia de propionil-CoA deshidrogenasa fue propuesta por primera vez en el anabolismo del propionato de Clostridium propionicum (Cardon y col., 1947; Leaver y col., 1955) y de Megasphaera elsdenii (Baldwin, Wood y Emery, 1961 y 1965).

En 1953, Mahler y Huennekens postularon una ruta degradativa del propionato existente en la mitocondria de hígado de conejo en la que estaban implicados los ácidos en vez de los acil-CoA y una transformación racémica del L-lactato a D-lactato.

La utilización de aceptores electrónicos en reacciones de oxidorreducción fue probada por Quastel (1957) como una técnica que proporcionaba buenos resultados en

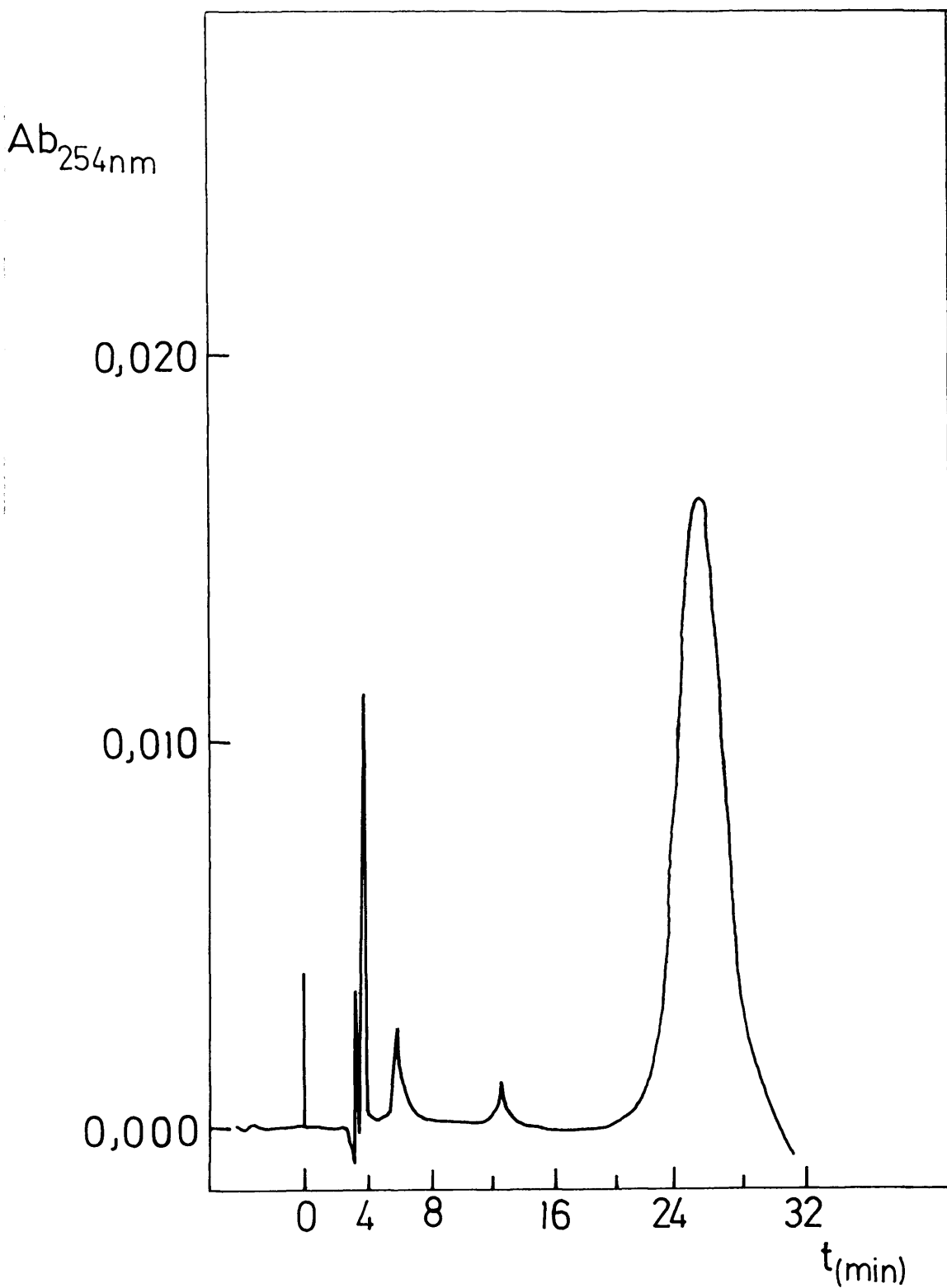


FIGURA 23a. Cromatograma de elución de la mezcla de la reacción propionil-CoA deshidrogenasa a tiempo 0 minutos. El ensayo se realizó preparando la muestra según se describe en la Sección III. 2.13. 2.2. El eluyente el descrito en los anteriores cromatogramas.

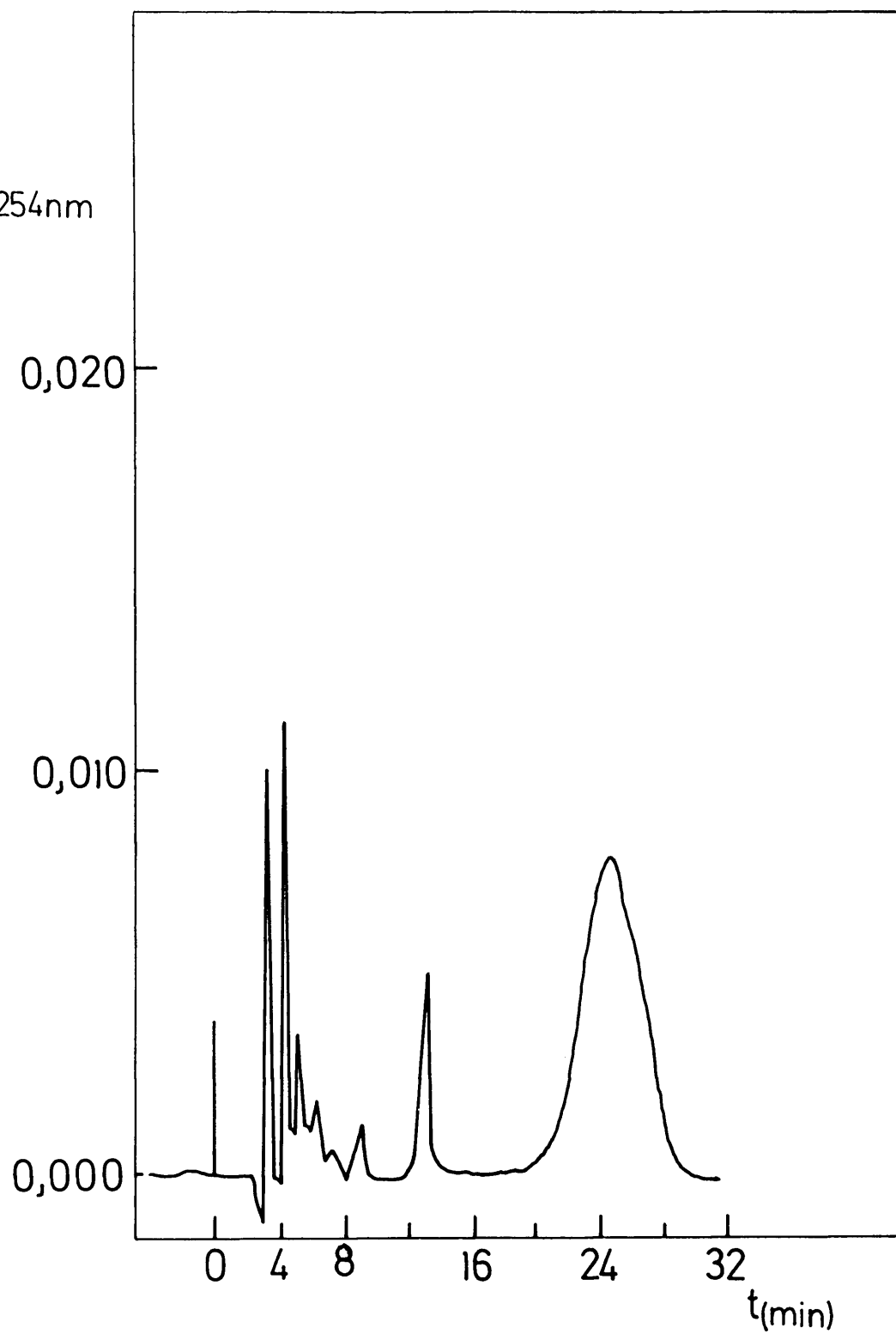


FIGURA 23b. Cromatograma de elución de la mezcla de la reacción propionil-CoA deshidrogenasa a tiempo 10 minutos. El ensayo se realizó preparando la muestra según se describe en la Sección III. 2. 13.2.2. El eluyente es el descrito en los anteriores cromatogramas.

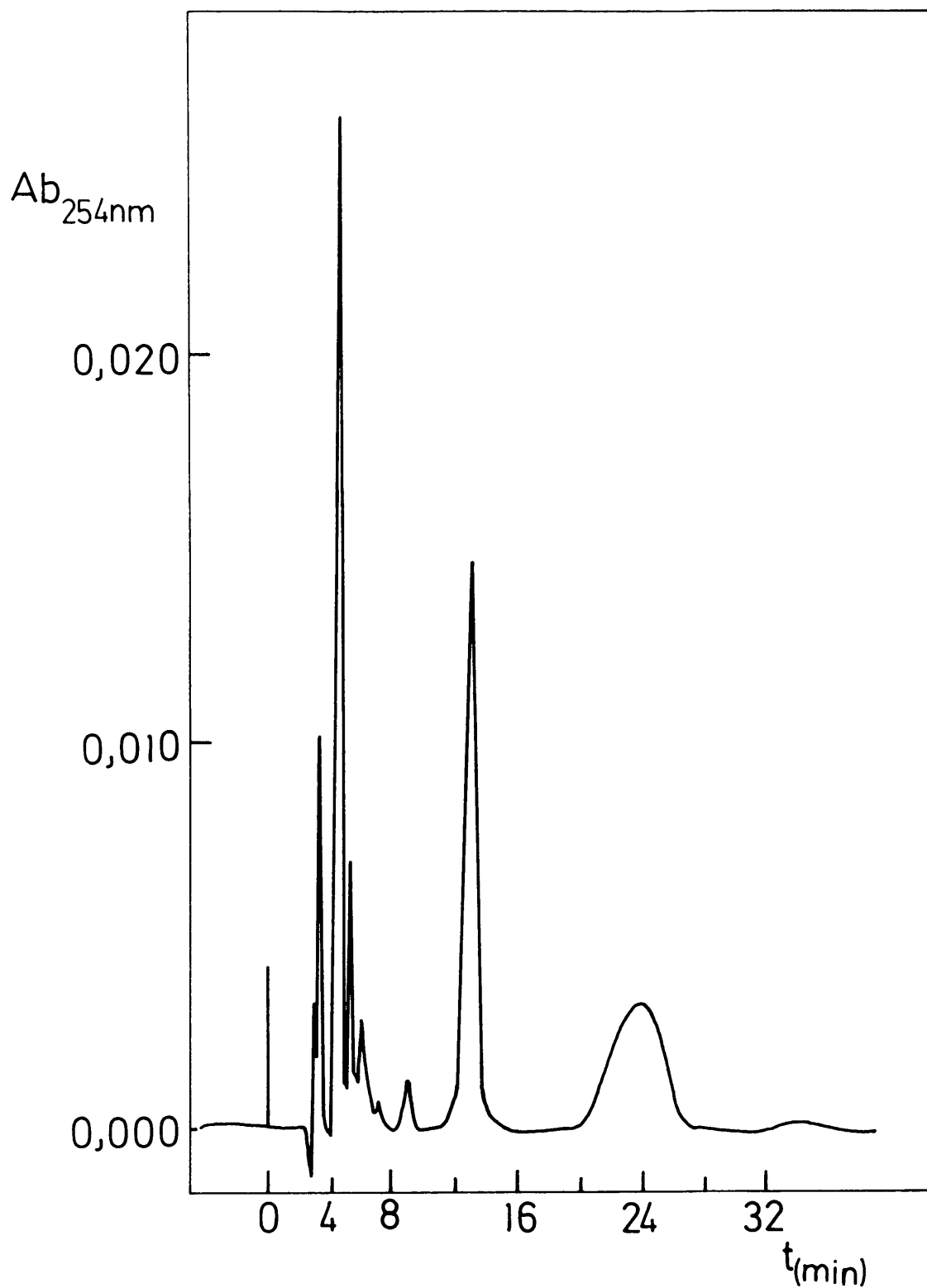


FIGURA 23c. Cromatograma de elución de la mezcla de la reacción propionil-CoA deshidrogenasa a tiempo 30 minutos. El ensayo se realizó preparando la muestra según se describe en la Sección III. 2.13.2.

2. El eluyente es el descrito en anteriores cromatogramas.

el estudio de las deshidrogenasas dependientes de nucleótidos de flavina. Por medio de ella, Stadtman (1956), Vagelos y Earl (1959) en Clostridium kluyveri, y Callely y Lloyd (1964) en Prototheca zopfii, detectan la presencia de una enzima con actividad propionil-CoA deshidrogenasa. Otros autores a través de estudios respirométricos con propionato radioactivo (Wegener, Reeves y Ajl, 1967a y b; Kay, 1972) en E. coli E-26 y E. coli K₁₂ cepas K_I y K_{II}, respectivamente, demuestran la formación de ¹⁴CO₂ proveniente del C del propionato e indican como evidente la actividad deshidrogenásica sobre el propionil-CoA.

Por otra parte, Hodgson y McGarry (1968b) en Moraxella lwoffii determinan la actividad en condiciones anaeróbicas de una deshidrogenasa de propionil-CoA que requiere como cofactor NAD y detectan la presencia en extractos crudos de una enzima que hidroliza los acil-CoA y los acilfosfatos.

La presencia de enzimas, que catalizan la oxidación de acil-CoA tio-ésteres saturados para dar productos 2-3 insaturados, ha sido estudiada, entre otros, por Mahler (1962) y Schmid y col. (1981) en hígado de ternera, por Frerman y col. (1980) en hígado de cerdo y por Beinert (1962) en hígado de ambos organismos.

Más recientemente, Williamson y Engel (1984) y Shaw y Engel (1984) demuestran que estas deshidrogenasas de ácidos grasos, denominadas genéricamente SCAD (Short Chain Acyl Dehydrogenase), son enzimas de baja especificidad que requieren flavoproteínas transferidoras de electrones (ETF) " in vivo " y que " in vitro " la proteína transferidora puede ser reemplazada por colorantes o sistemas de colorantes aceptores de electrones , tales como PMS, DCPIP ó Meldolablau.

IV.6.6. Actividad acrilil-CoA hidratasa

La transformación de acrilil-CoA en lactil-CoA se lleva a cabo a través de la acrilil-CoA hidratasa y su actividad se determina por acoplamiento con la reacción de la lactato deshidrogenasa purificada; la presencia de una proteína diaforasa facilita la transferencia de electrones al aceptor coloreado utilizado (TTZ).

La descripción del ensayo utilizado para la determinación de la actividad de esta enzima aparece detallada en la Sección III.2.11.9.

En las Figuras 24 y 25 se muestran las actividades de la acrilil-CoA hidratasa en extractos celulares de Salmonella typhimurium LT2 crecida en propionato y en

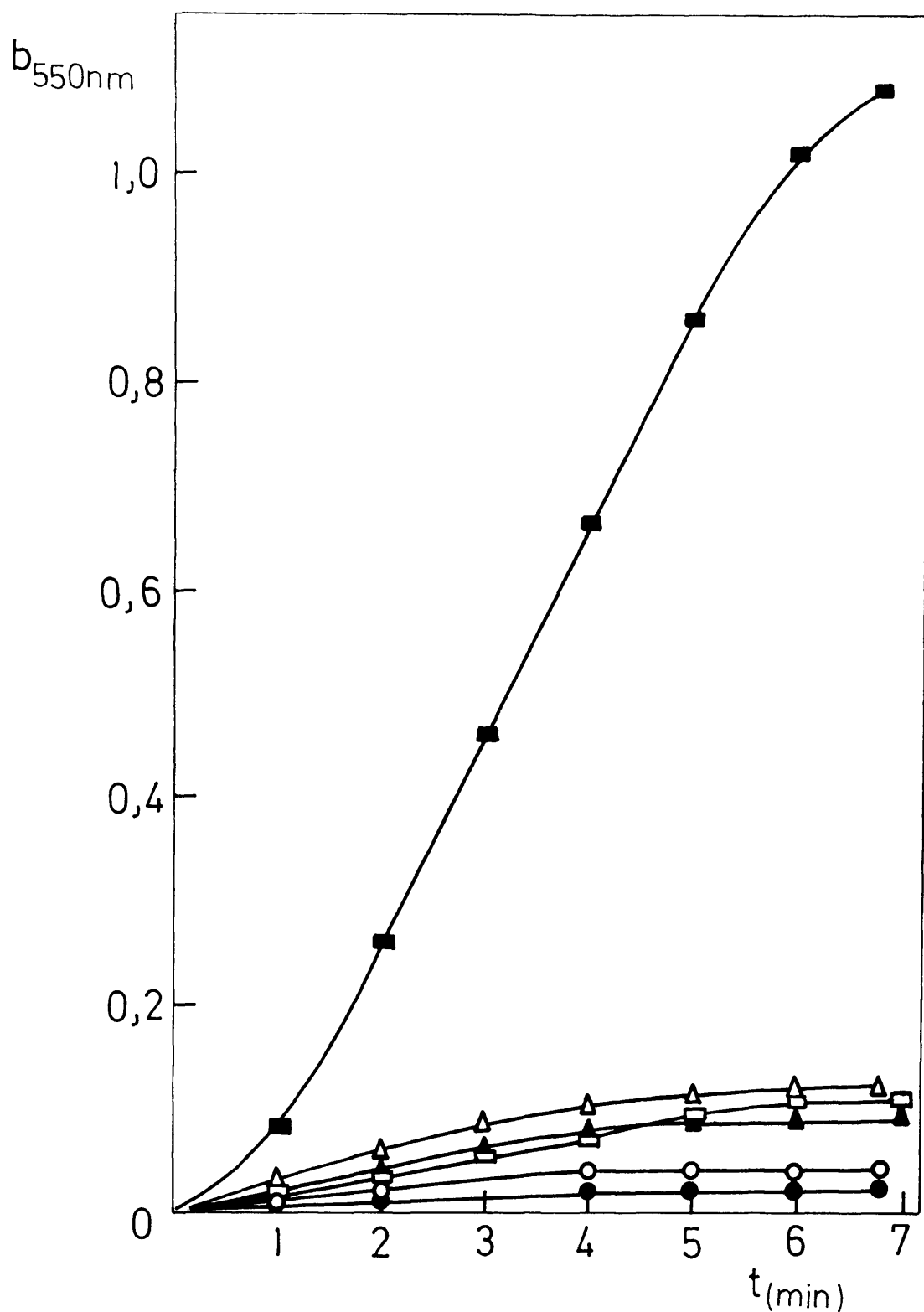


FIGURA 24. Actividad acrilil-CoA hidratasa en extractos de Salmonella typhimurium, crecida en propionato. El ensayo ha sido realizado según se describe en la Sección III. 2.11.9. En los ensayos referencia se omitió alguno de los componentes de la mezcla de ensayo: NAD (-○-), LDH (-●-), diaforasa (-▲-), extractos (-□-) ó acrilil-CoA (-Δ-); mezcla completa (-■-).

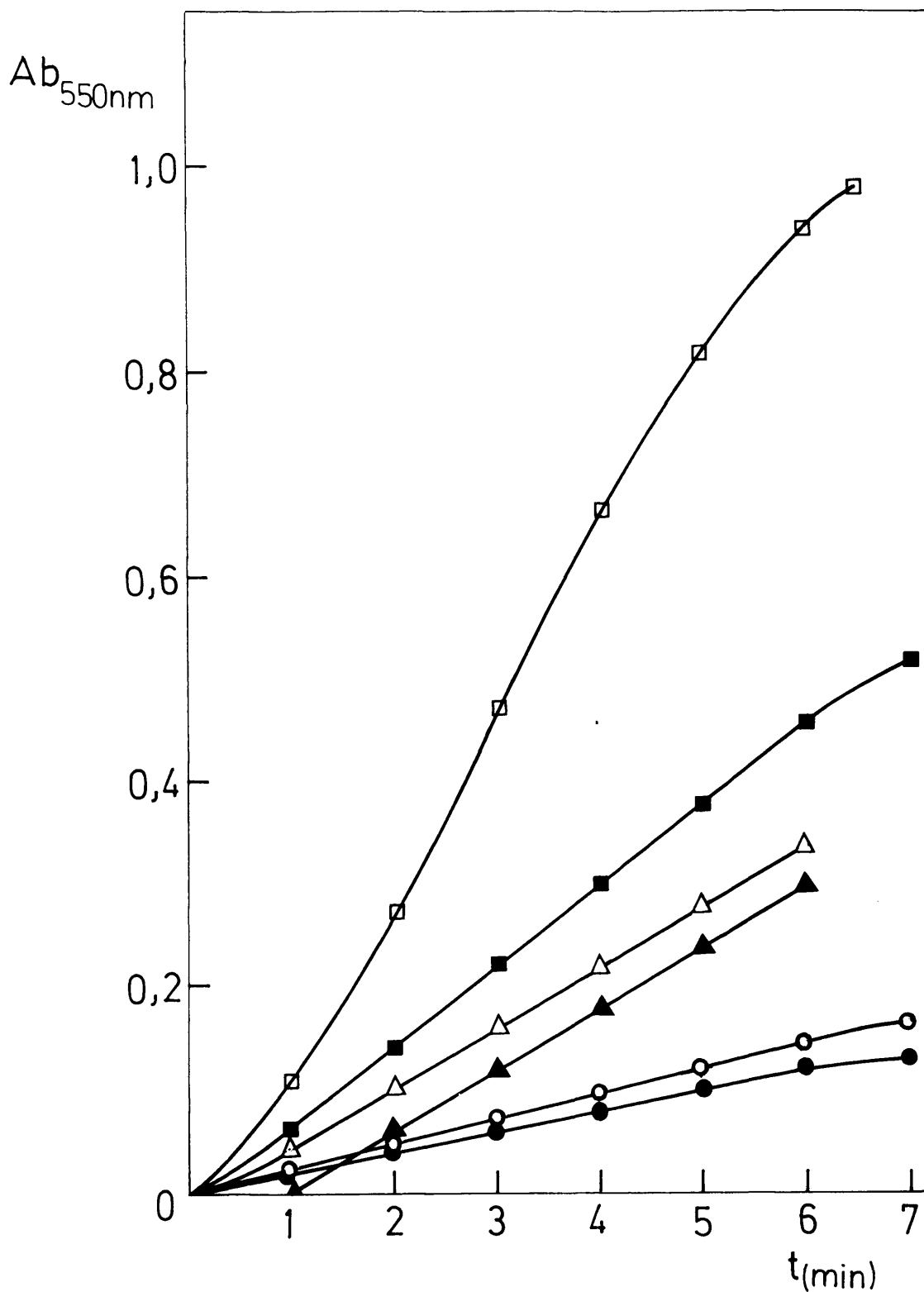


FIGURA 25. Actividad acrilil-CoA hidratasa en extractos de Salmonella typhimurium, crecida en diferentes sustratos. El ensayo se realizó como se describe en la Sección III. 2.11.9., utilizando extractos celulares de Salmonella, crecida en: propionato (-□-), lactato (-Δ-), acetato (-▲-), glicerol (-○-) ó glucosa (-●-), y extractos celulares de Megasphaera elsdenii, crecida en lactato (-■-).

distintos sustratos (glucosa, glicerol, acetato ó lactato). De su examen se puede facilmente observar que la reacción es claramente positiva en células crecidas en propionato, con una actividad aún mayor que la que presentan las células de Megasphaera elsdenii, utilizadas como control de esta reacción, en la que se ha confirmado que esta enzima es clave para el metabolismo de este microorganismo cuando crece sobre lactato.

La acrilil-CoA hidratasa ha sido estudiada y parcialmente purificada a partir de bacterias anaeróbicas ruminales tales como Clostridium propionicum y Megasphaera elsdenii. En estos organismos se ha observado que el propionato es uno de los productos del metabolismo de los nutrientes, formándose a partir de lactato el cual se transforma en acrilato y éste a su vez en propionato, estando implicados como intermediarios de la secuencia de reacciones descrita los acil-CoA correspondientes (Baldwin, 1966). Los valores hallados para la actividad de esta enzima en los extractos celulares de los microorganismos anteriormente citados crecidos en lactato (Baldwin y col., 1961 y 1965) son semejantes a los obtenidos en los de Salmonella typhimurium crecida en propionato.

IV.6.7. Actividad lactato deshidrogenasa

La escisión del lactil-CoA por acción de una transferasa o una hidrolasa ha sido descrita en células de Moraxella lwoffii (Hodgson y McGarry, 1968a y b), Escherichia coli K₁₂ cepas K_I y K_{II} (Kay, 1972), Megasphaera elsdenii (Baldwin y col., 1965) y E. coli E-26 (Wegener, Reeves y Aji, 1967a y b). Este proceso parece que es ventajoso para la bacteria, al menos, en dos aspectos: primero, porque el CoA puede ser utilizado en nuevas reacciones y segundo porque el lactato puede ser transformado en piruvato aprovechando los altos niveles de LDH, que se encuentra constitutivamente en las células.

Por ello se determinó la actividad LDH en extractos de Salmonella, según se describe en la Sección III.2.11.10.

De la Tabla XXXV se desprende que, como se esperaba, los valores de actividad específica de la lactato deshidrogenasa son muy semejantes e independientes, no sólo en lo que respecta al nutriente utilizado como fuente de carbono, sino también en lo referente a la fase de crecimiento del microorganismo.

TABLA XXXV. Actividad lactato deshidrogenasa en células de S. typhimurium crecidas en diferentes sustratos y fases de crecimiento

SUSTRATO DE CRECIMIENTO	ACTIVIDAD ESPECIFICA ($\mu\text{mol NADH oxidado min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$)		
	Fase logarítmica		Fase estacionaria
	1ª Mitad	2ª Mitad	
Glucosa	0'256	0'30	0'350
Succinato	0'220	0'47	-
Citrato	0'250	0'23	-
Lactato	0'350	0'39	0'367
Piruvato	0'390	0'50	-
Acetato	0'350	0'40	0'500
Propionato	0'410	0'43	0'430

Los ensayos se realizaron según se describe en la Sección III. 2.11.10.

Los datos expresados son la media aritmética de tres determinaciones.

IV. 6.8. Actividad fosfoenolpiruvato sintetasa

La formación de ácidos dicarboxílicos C_4 a partir de intermediarios de la ruta de Embden-Meyerhoff depende de la carboxilación del fosfoenolpiruvato (Theodore y Engelsberg, 1964; Ashworth, Kornberg y Ward, 1965; Ashworth y Kornberg, 1966). Como en E. coli y S. typhimurium la piruvato quinasa es poco significativa en el sentido piruvato \rightarrow PEP (Krebs y Kornberg, 1957; Utter, 1963) la síntesis de este compuesto se realiza a través de la transformación directa a partir de piruvato. Cooper y Kornberg (1965, 1967, 1968) y Cooper (1969) han demostrado de forma prolija que la actividad PEP sintetasa es esencial en el crecimiento de la bacteria sobre piruvato y lactato. Este hecho fue confirmado con mutantes defectivos en esta enzima que son incapaces de crecer en ambos sustratos. En todos los casos investigados, dichos mutantes (lact⁻pir⁻) tampoco utilizan el propionato como fuente de carbono y energía, por lo que se puede deducir que la transformación piruvato \rightarrow PEP es clave en el metabolismo de este compuesto y, por consiguiente, las células crecidas en propionato deberían tener niveles elevados de PEP sintetasa al inducirse su síntesis como sucede cuando crecen en sustratos gluconeogénicos.

En la Tabla XXXVI se observa que la actividad

PEP sintetasa de S. typhimurium crecida en propionato es semejante en todos los sustratos gluconeogénicos ensayados y tres veces mayor que en glucosa, que es degradada glucolíticamente. El hecho de que la actividad de esta enzima cuando las células crecen en lactato + glicerol tenga un valor semejante a cuando crecen únicamente en lactato, ha sido aprovechado para demostrar la ausencia de actividad PEP sintetasa en mutantes incapaces de crecer en lactato, propionato ó piruvato y para conocer la naturaleza de la reversión de estos mutantes.

Del examen de la Tabla XXXVII se desprende que únicamente los revertientes AG 517 lact⁺ y 4017 lact⁺ recuperan la actividad PEP sintetasa. Sin embargo, tanto estos revertientes como los AG 517 prp⁺, AA 306 prp⁺ y AA 306 lact⁺ muestran un fenotipo idéntico al de la cepa salvaje (Tablas XIX, XXI y XXII). Estos tres últimos revertientes, caracterizados como constitutivos en isocitrato liasa (Sección IV.6.4.1.), y que sorprendentemente han recuperado la capacidad de crecer en propionato, a pesar de carecer de actividad PEP sintetasa, deben implicar el ciclo del glioxilato en el metabolismo de este compuesto. Es un hecho conocido (Ashworth y Kornberg, 1963) que el PEP es además un inhibidor no competitivo muy activo de la isocitrato liasa, por lo que en condiciones normales la ruta del glioxilato no tiene operatividad en el metabolismo del pro

TABLA XXXVI. Actividad PEP sintetasas de S. typhimurium crecida en diferentes sustratos

SUSTRATO DE CRECIMIENTO	ACTIVIDAD ESPECIFICA (μmol piruvato transformado $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ proteína) $\times 10^{-3}$
Glucosa	30'0
Lactato + Glicerol	90'0
Propionato	92'1
Succinato	120'2
Acetato	100'1
Lactato	82'0

Los ensayos se realizaron según se describe en la Sección III. 2.11.11.

Los datos expresados son la media aritmética de tres determinaciones.

y revertientes

ORGANISMO	SUSTRATO DE CRECIMIENTO	ACTIVIDAD ESPECIFICA (μ mol piruvato trans- formado/min/mg)
LT2 <u>tim</u> ⁻	Glucosa + Timina	0'022
	Lactato + Glicerol + Timina	0'094
AG 517	Lactato + Glicerol	0'001
AG 517 <u>acet</u> ⁺	Lactato + Glicerol	0'000
AG 517 <u>prp</u> ⁺	Lactato + Glicerol	0'001
AG 517 <u>lact</u> ⁺	Lactato + Glicerol	0'950
	Glucosa	0'100
AA 306	Lactato + Glicerol + Timina	0'000
AA 306 <u>prp</u> ⁺	Lactato + Glicerol + Timina	0'002
AA 306 <u>lact</u> ⁺	Lactato + Glicerol + Timina	0'000
LT2 <u>leu</u> ⁻	Lactato + Glicerol + Leucina	0'085
A ₁	Lactato + Glicerol + Leucina	0'000
4017	Lactato + Glicerol + Leucina	0'000
4017 <u>lact</u> ⁺ (G)	Glucosa + Leucina	0'090
	Lactato + Leucina	0'100
4017 <u>lact</u> ⁺ (P)	Lactato + Leucina	0'020
	Glucosa + Leucina	0'021

Los ensayos se realizaron según se describe en la Sección III.
2.11.11.

Los datos expresados son la media aritmética de tres determinaciones.
AG 517, AA 306, A₁ y 4017 son mutantes defectivos en PEP sintetasa procedentes de S. typhimurium LT2 tim⁻ y leu⁻. G y P corresponde al tamaño de las colonias (Grandes y Pequeñas) con que aparecen en las placas de Petri.

pionato en S. typhimurium. Basados en la acción de este compuesto, Wegener y col. (1969) propugnan que en las primeras fases del crecimiento de E. coli E-26 y K₁₂, la isocitrato liasa no es significativamente importante y cuando el nivel intracelular del PEP desciende, como parece suceder en las fases posteriores del crecimiento, el ciclo del glioxilato comienza a operar de forma efectiva. Sin embargo, en E. coli W (Wegener y col., 1969), como parece suceder en S. typhimurium en condiciones normales de crecimiento sobre propionato, la actividad PEP sintetasa es esencial y el ciclo del glioxilato no se encuentra, en ninguna fase del crecimiento, implicado en el catabolismo de este compuesto.

IV. 6.9. Actividad PEP carboxilasa

La actividad PEP carboxilasa en la ruta del catabolismo del propionato via acrilato se puede deducir como una consecuencia de la actividad PEP sintetasa. La determinación se realizó según el método de Maeba y Sanwal descrito en la Sección III. 2.11.12.

Se puede observar que los niveles de actividad enzimática PEP carboxilasa en extractos de células crecidas en propionato son semejantes a las crecidas en glucosa y muy superiores a las crecidas en succinato y acetato en

TABLA XXXVIII. Actividad PEP carboxilasa en extractos celulares de *S. typhimurium*

SUSTRATO DE CRECIMIENTO	ACTIVIDAD ESPECIFICA ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$)
Glucosa	0'122
Succinato	0'021
Propionato	0'115
Acetato	0'020

Los ensayos se realizaron según se describe en la Sección III. 2.11.12.

Los datos expresados son la media aritmética de dos determinaciones.

cuyo catabolismo no se encuentra esencialmente implicada esta enzima. (Tabla XXXVIII)

Esta enzima juntamente con la PEP sintetasa, conectadas en una secuencia anaplerótica, es esencial en el crecimiento de S. typhimurium sobre propionato. En E. coli K_{12} cepas K_I y K_{II} (Kay, 1972) las actividades de dichas enzimas no parecen ser necesarias, ya que la formación de intermediarios del ciclo de Krebs puede llevarse a cabo por medio de las rutas del α -hidroxiglutarato y el ciclo del glioxilato, y aunque la ruta del acrilato sea operativa en su mayor parte, según este autor, el piruvato se transforma en acetil-CoA.

Esta situación es semejante a la descrita para E. coli W, E-26 y K_{12} en las primeras fases de crecimiento (Wegener y col., 1969).

IV.6.10. Conversión del propionato en piruvato

Para confirmar la transformación de propionil-CoA en piruvato se realizó un último experimento consistente en la determinación de la producción continua de cetoácidos, incubando los extractos celulares crecidos en diferentes fuentes de carbono con distintas concentraciones de sustratos.

El procedimiento se fundamenta en que, si el piruvato es el primer ceto-ácido intermediario de la oxidación del propionato, puede seguirse su continua producción utilizando fenilhidracina (Dixon y Kornberg, 1959; Hodgson y McGarry, 1968b).

En la Figura 26, en que se muestra la formación de ceto-ácido, se observa que el aumento de la absorbancia a 324 nm es significativamente mayor cuando en la mezcla de reacción se encuentra 0'5 mM de propionil-CoA y 2 mg/ml de NAD. Experimentos similares realizados por Hodgson y McGarry (1968b) con extractos de Moraxella lwoffii, para la que se ha propuesto la ruta del acrilato, han proporcionado unos datos relativos a la formación de piruvato muy semejantes a los de S. typhimurium LT2.

Dos tipos de experimentos basados en el anterior fueron realizados posteriormente; en uno de ellos se utilizaron extractos celulares de S. typhimurium crecida en glucosa, glicerol, acetato, lactato ó propionato; en otro, se varió la concentración de propionil-CoA en la mezcla de reacción. Se observa en la Figura 27 que la velocidad de formación de fenilhidrazona aumenta únicamente con extractos de células crecidas en lactato ó en propionato. Por otra parte, en la Figura 28 se muestra que la velocidad de formación es directamente proporcional a la concen-

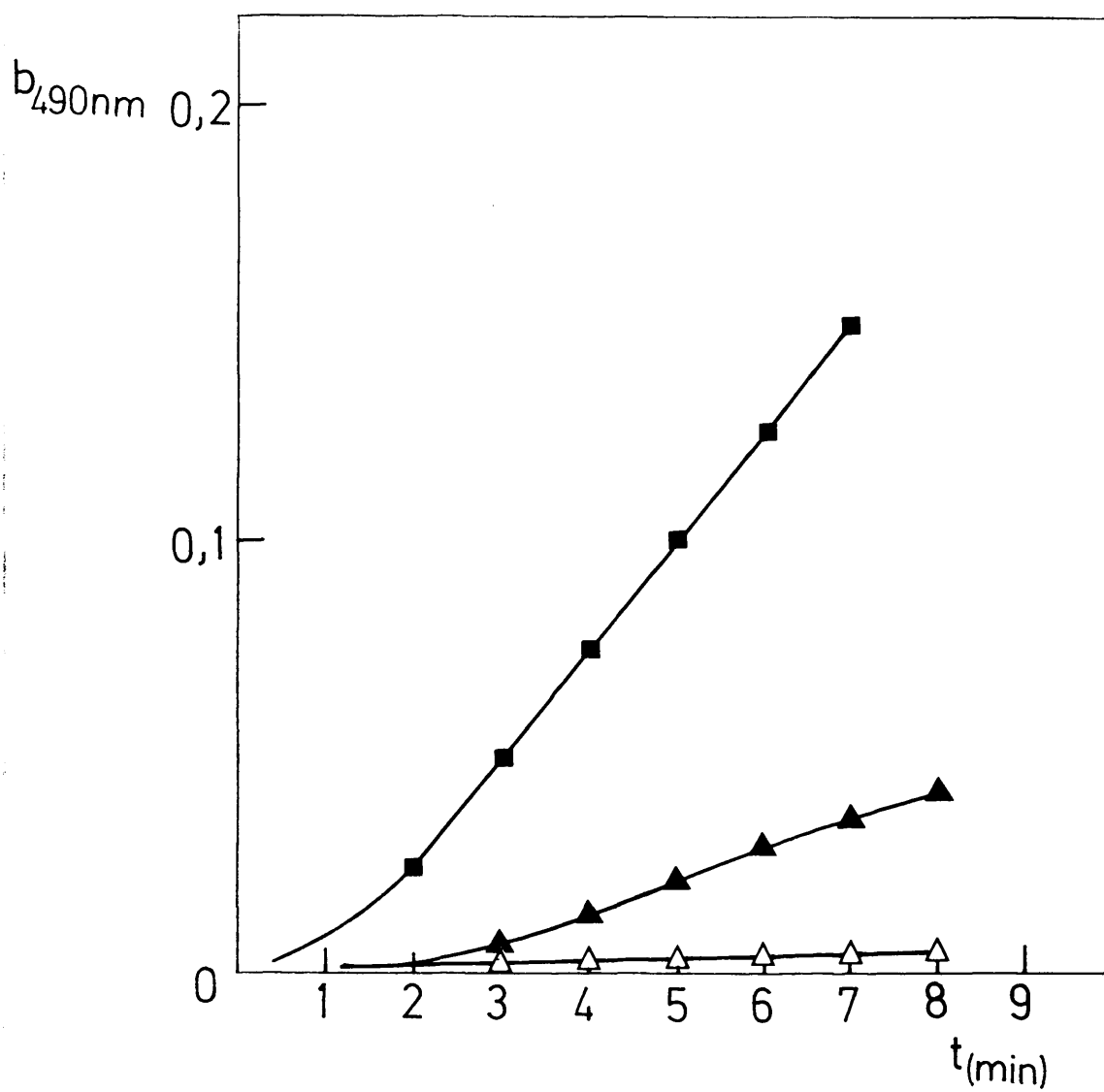


FIGURA 26. Formación de ácidos ceto por incubación de extractos de *Salmonella typhimurium*, crecida en propionato: mezcla de reacción completa con propionil-CoA 0'5 mM (-■-), idem con propionil-CoA 0'05 mM (-▲-) y en ausencia de algún componente de la mezcla (-△-). Los ensayos se realizaron según se describe en la Sección III. 2.11.13.

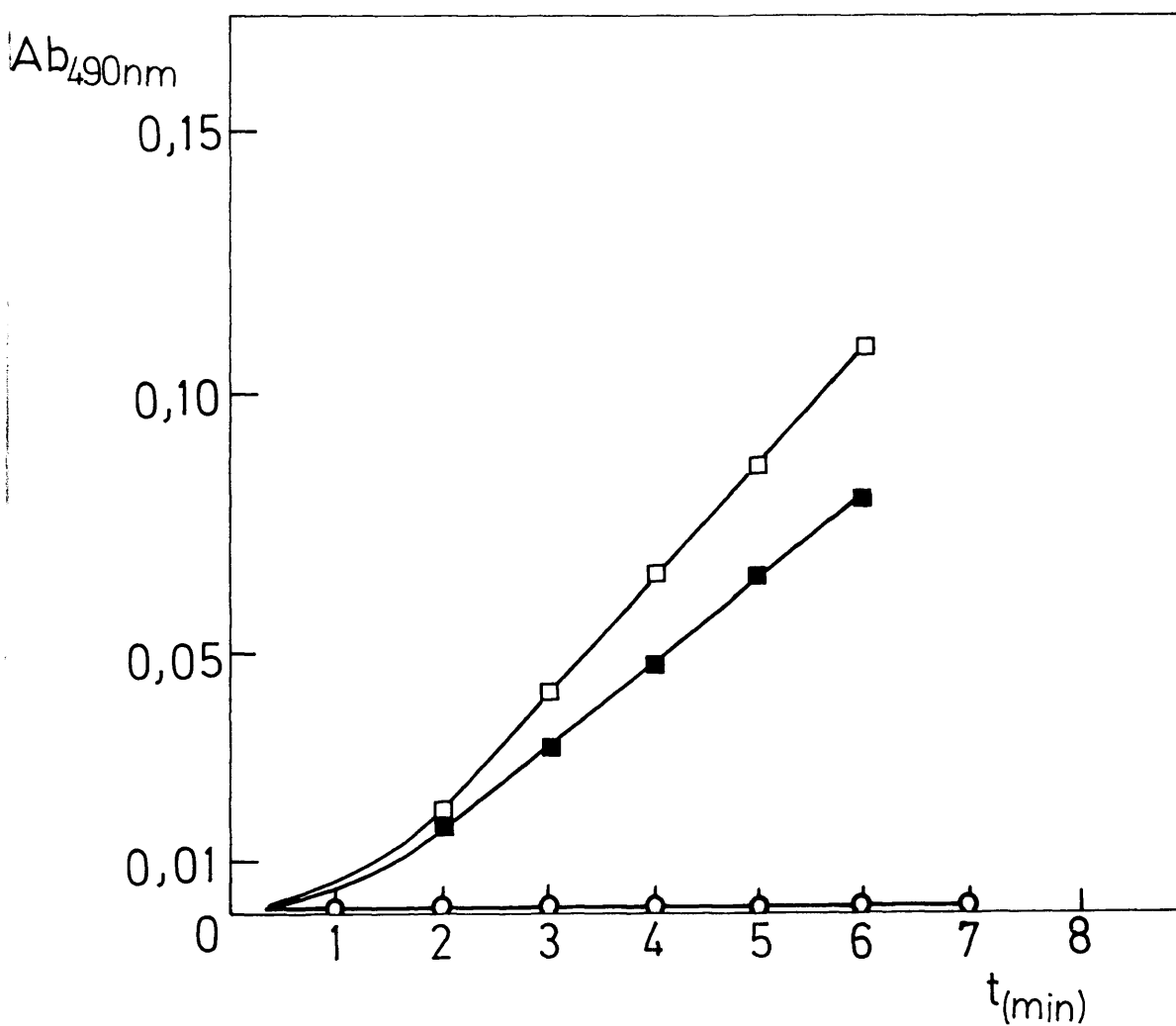


FIGURA 27. Formación de ácidos ceto por incubación de extractos de *Salmonella typhimurium*, crecida en diferentes sustratos: propionato (-□-), lactato (-■-) y glicerol, glucosa ó acetato (-○-). Los ensayos se realizaron según se describe en la Sección III. 2.11.13.

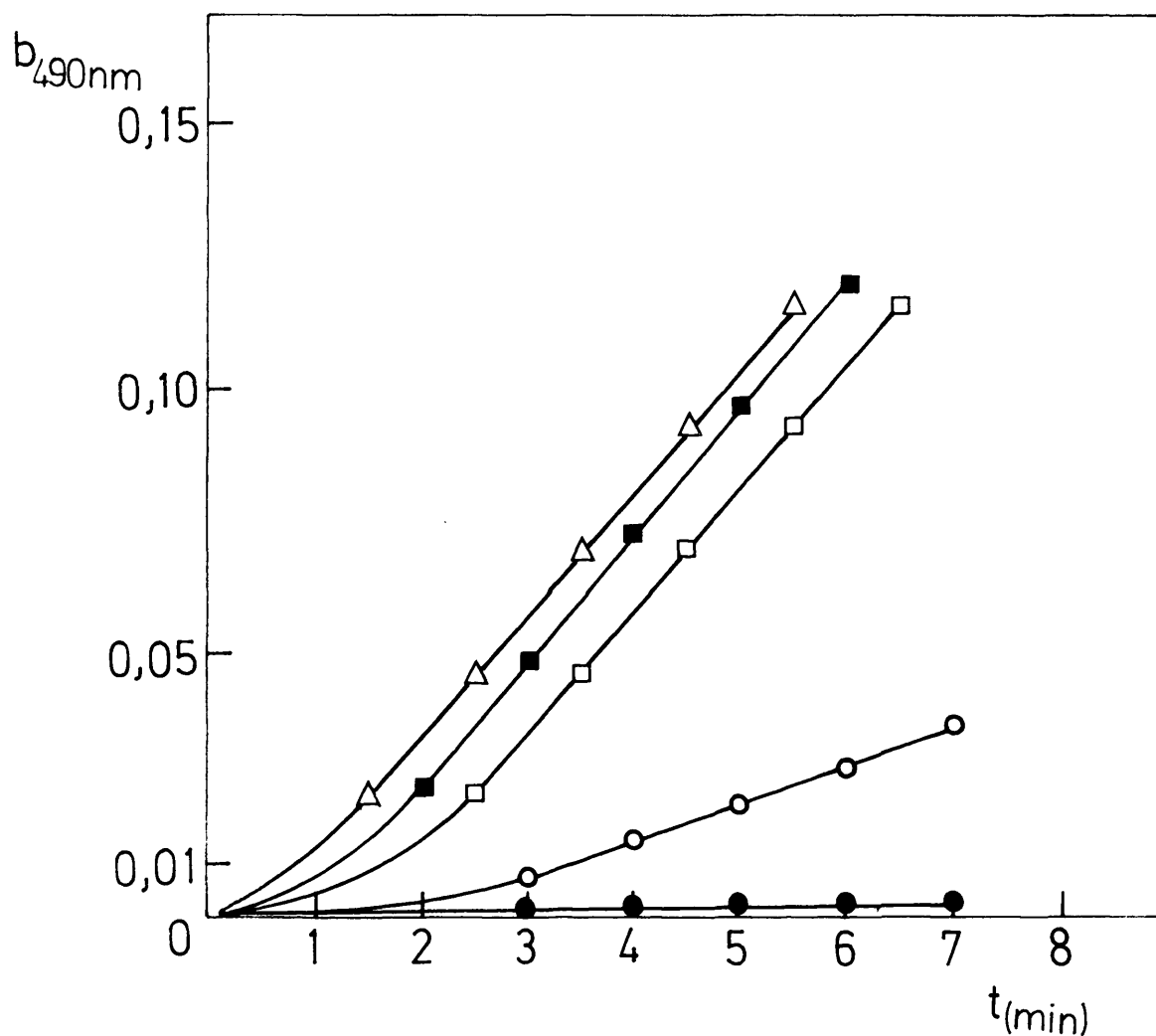


FIGURA 28. Variación en la formación de ácidos ceto por incubación de extractos de *Salmonella typhimurium*, crecida en propionato, en función de la concentración de propionil-CoA: 1 mM (-Δ-), 0.5 mM (-■-), 0.25 mM (-□-), 0.05 mM (-○-) y 0.0 mM (-●-). Los ensayos se realizaron según se describe en la Sección III. 2.11.13.

tración de propionil-CoA que existe en la mezcla de reacción y que esta velocidad alcanza su máximo valor a partir de 0'25 mM de propionil-CoA.

Estos experimentos confirman la transformación continua del propionil-CoA en piruvato.

IV.7. Localización aproximada del locus correspondiente al fenotipo prp^-

Los ensayos de transferencia episomal se iniciaron utilizando la técnica descrita en la Sección III.2.14 y empleando un conjunto de cepas F' de Escherichia coli (Tabla II) que practicamente cubre todo el genoma bacteriano (Low y Falkinham, 1972). Las cepas ensayadas fueron Salmonella typhimurium AA 303, AA 304, AA 305 y AA 310, las cuales presentan fenotipo prp^- (Tablas XIV y XV).

Como control de la transferencia episomal fue utilizado un mutante de Escherichia coli K₁₂ cepa X₂₈₉ (AA 101) defectivo en el catabolismo del propionato, obtenido por el mismo procedimiento con que se obtuvieron los mutantes de S. typhimurium. El AA 301 muestra, cuando se ensaya su crecimiento en diferentes sustratos, un fenotipo idéntico al de Escherichia coli LS5221 cuyo locus genético, correspondiente al propionato, ha sido localizado en

el mapa genómico de forma aproximada (Spratt y col.,1981).

Del examen de la Tabla XXXIX se desprende que el mayor crecimiento se obtiene del proceso de transferencia de las cepas F 104, F 112 y F 117 con los mutantes prp de S. typhimurium y E. coli. En conjunto las tres cepas F' comprenden desde el minuto 88 al 8 del mapa genético (Figura 29).

Posteriormente se realizaron experimentos de transferencia episomal, según se ha descrito en Material y Métodos, concretados a las cepas F 104, F 112 y F 117 y a los mutantes AA 310 y AA 101, por haberse obtenido de los cruzamientos entre ellos los resultados más positivos. Después de incubar durante 48 horas las placas que contienen los posibles recombinantes se observó que el número de éstos en las combinaciones F 104 x AA 310 y F 104 x AA 101 era entre 350 y 400 por placa, mientras que en el resto de los cruzamientos este número era notablemente inferior.

Como los marcadores cromosómicos comunes a las cepas F 104, F 112 y F 117 son leu B6, lac Y1, xyl-7, sup E44, es lógico pensar que el gen para el propionato se encuentre entre los minutos 97-99 (Bachmann y Low,1980; Sanderson y Hartman, 1978), tanto del genoma de E. coli como del de S. typhimurium (Figuras 29 y 30). Estos resul-

TABLA XXXIX. Crecimiento de recombinantes procedentes del ensayo previo de transferencia episomal

F'	MUTANTES				
	AA 303	AA 304	AA 305	AA 310	AA 101
F 506	-	-	-	-	-
F 500	-	-	-	-	-
F 254	-	-	-	-	-
F 152	-	-	-	-	-
F 150	-	-	-	-	-
F 143	-	-	-	-	-
F 142	-	-	-	-	-
F 141	-	-	-	-	-
F 140	-	-	-	-	-
F 129	-	-	-	-	-
F 128	-	-	-	-	-
F 104	++	++	++	+++	+++
F 111	-	-	-	-	-
F 112	+	+	++	++	++
F 116	-	-	-	-	-
F 117	+	+	+	++	++
F 123	-	-	-	-	-
F 126	-	-	-	-	-
F 133	-	-	-	-	-

Los signos corresponden: los positivos, crecimiento abundante (+++), crecimiento normal (++) y crecimiento escaso (+); los negativos a no crecimiento (-).

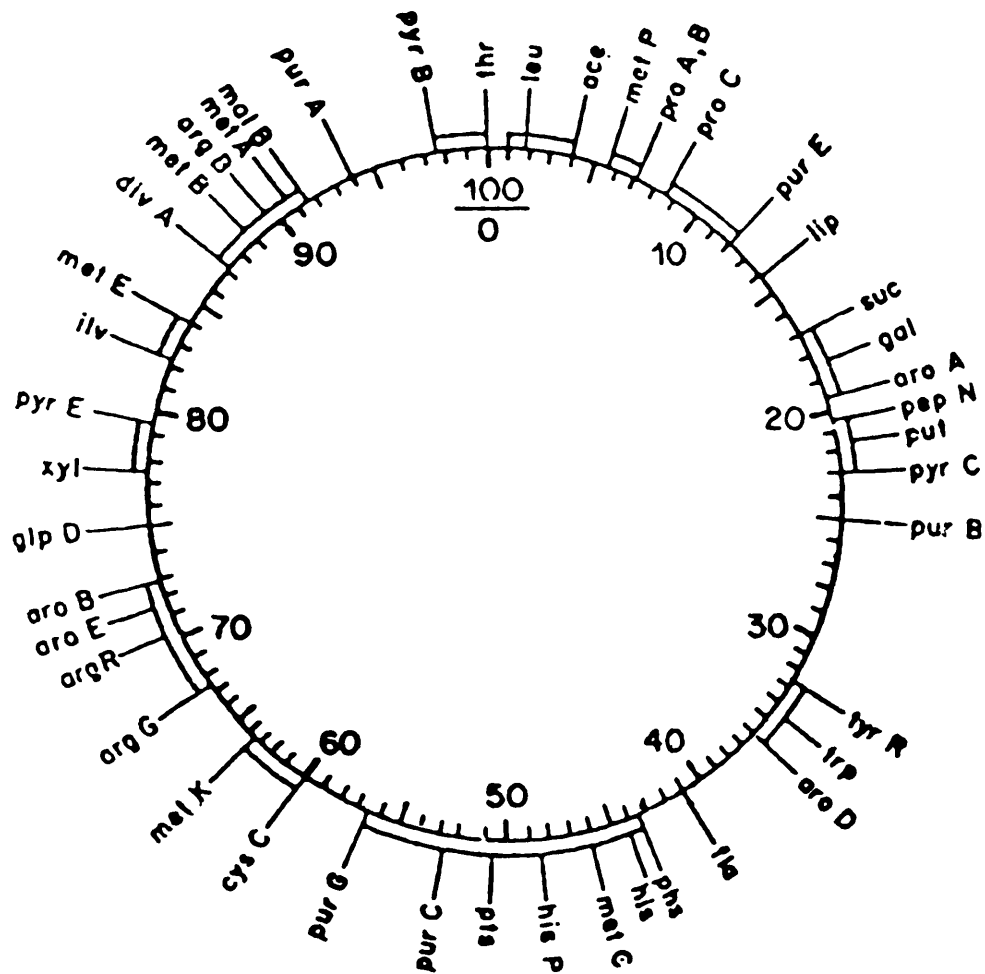


FIGURA 30. Mapa genético de *Salmonella typhimurium* LT2 (Sanderson y Hartman, 1978).

tados están de acuerdo con los obtenidos por Spratt y col. (1981), que determinan que el locus genético correspondiente al fenotipo prp⁻ se localiza, aproximadamente en el minuto 98 del cromosoma de Escherichia coli.

La escasa presencia de marcadores genéticos, con fenotipo fácilmente seleccionable, en la región 97-99 minutos del cromosoma dificulta un mapeo preciso, con procedimientos más finos de recombinación genética, del gen prp.

Este gen prp, dado el fenotipo del mutante, debe corresponder a alguna de las enzimas diferenciales del metabolismo del propionato con el resto de intermediarios que pueden proceder del catabolismo de otros sustratos, es decir la propionil-CoA sintetasa, propionil-CoA deshidrogenasa ó acrilil-CoA hidratasa.

La exacta identificación de la enzima defectiva prp⁻ no ha podido llevarse a cabo, ya que cuando se ha utilizado como sustrato de crecimiento propionato junto con otro compuesto, en Salmonella typhimurium LT2, las enzimas diferenciales de la ruta catabólica del propionato no se han podido inducir, en las condiciones normales de crecimiento.

V. CONCLUSIONES

V. CONCLUSIONES

Se ha realizado un trabajo para conocer la ruta degradativa del propionato en Salmonella typhimurium LT2, llegándose a las siguientes conclusiones:

- 1.- Los ensayos respirométricos realizados con células enteras y permeabilizadas de Salmonella typhimurium sugieren que el sistema de transporte para el propionato es el mismo que el del acetato.
- 2.- Se ha encontrado un sistema de activación del propionato endógeno dependiente de ATP, en el que están implicadas dos reacciones sucesivas.
- 3.- La determinación de velocidades de crecimiento celular en presencia de propionato, propionato + vitamina B₁₂ y/o bicarbonato sódico indican que la ruta de carboxilación a succinato no es operativa en el catabolismo del propionato en ninguna de las fases de crecimiento.

4.- Los estudios sobre mutantes aislados utilizando propionato como medio selectivo, sugieren que las rutas degradativas de propionato, acetato, lactato y piruvato se encuentran relacionados entre sí; el análisis de revertientes conduce a la misma conclusión. Los mutantes defectivos en fosfoenolpiruvato sintetasa son incapaces de crecer sobre propionato.

5.- Los bajos niveles de actividad encontrados, en los extractos de células de Salmonella typhimurium LT2 crecida en propionato, correspondientes a α -hidroxiglutarato sintetasa, α -hidroxiglutarato descarboxilasa, semialdehído succínico deshidrogenasa y α -hidroxiglutarato liasa indican que ninguna enzima de las rutas del α -hidroxiglutarato se encuentra implicada en el catabolismo del propionato de esta bacteria.

6.- Cuando Salmonella typhimurium LT2 utiliza propionato, como fuente de carbono y energía, el ciclo del glioxilato no es operativo en ninguna de las fases de crecimiento. Sin embargo, en aquellas condiciones en que la isocitrato liasa es constitutiva, el catabolismo del propionato parece implicar este ciclo.

7.- La transformación propionil-CoA -----> acrilil-CoA es catalizada por una deshidrogenasa, dependiente de nucleótidos de flavina, cuya detección resultó particularmente difícil debido a la falta de un método de análisis adecuado. El acrilil-CoA, como producto de la reacción, se determinó por cromatografía líquido-líquido. Se ha observado la presencia de una hidrolasa de acilos de CoA que enmascara la acción de la deshidrogenasa "in vitro".

8.- Se ha encontrado alta actividad enzimática, en los extractos de células de Salmonella typhimurium LT2 crecida en propionato, de acrilil-CoA hidratasa, lactato deshidrogenasa, fosfoenolpiruvato sintetasa y fosfoenolpiruvato carboxilasa.

9.- Las investigaciones realizadas permiten proponer que la ruta degradativa del propionato en esta especie bacteriana transcurre según el esquema de la Figura 31, donde el propionil-CoA se transforma en piruvato via acrilil-CoA. El piruvato se puede transformar en acetil-CoA e incorporarse al ciclo de Krebs o convertirse en PEP con fines anapleróticos.

10.- A través de ensayos de transferencia episomal se demostró que el locus genético correspondiente al fenotipo prp⁻ se localiza, aproximadamente, entre los minutos 97-99 del genoma de Salmonella typhimurium LT2.

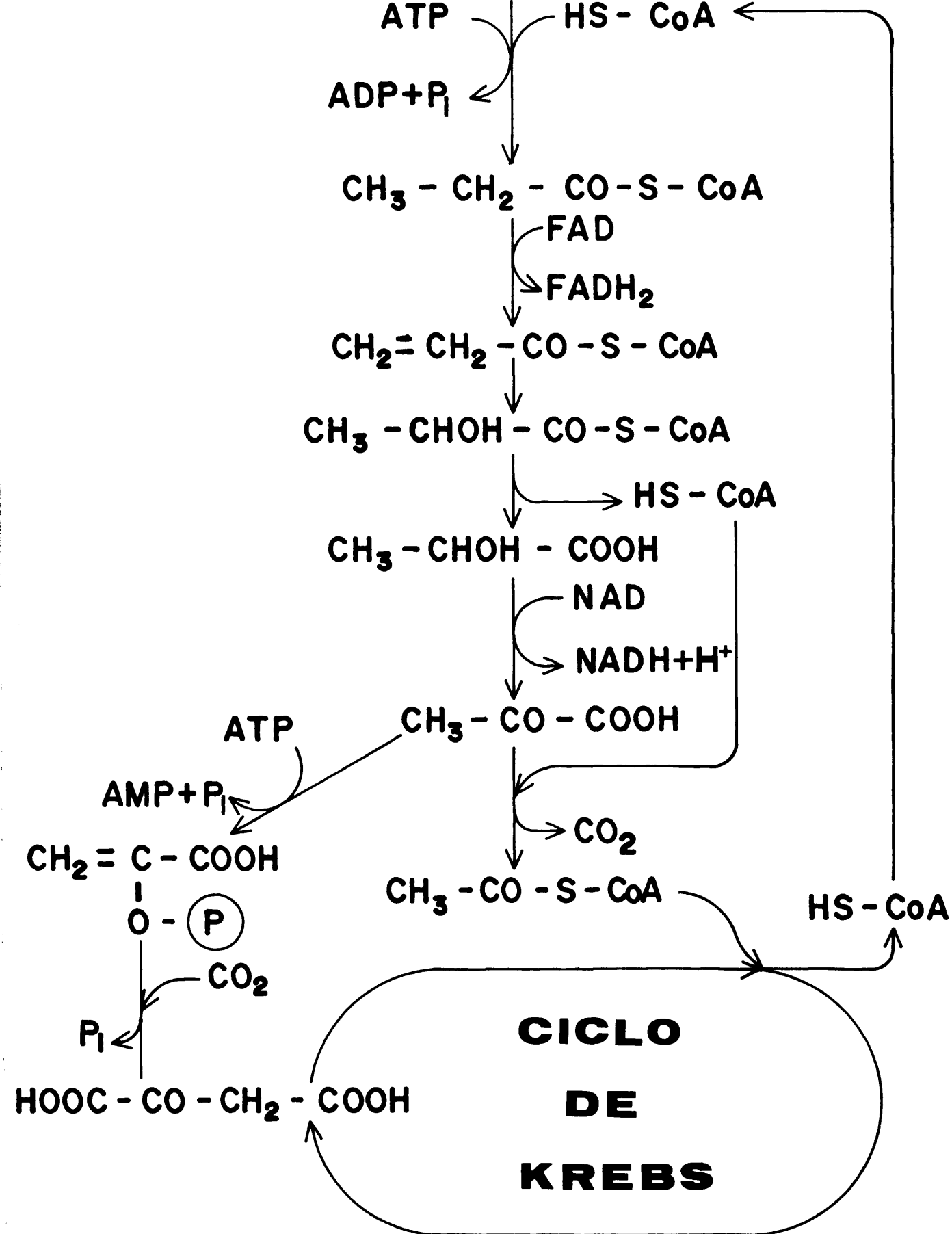


FIGURA 31. Ruta propuesta para la degradación del propionato en *Salmonella typhimurium* LT2.

VI. BIBLIOGRAFIA

VI. BIBLIOGRAFIA

ALONSO, M.J.; G-OLALLA, C. y GARRIDO-PERTIERRA, A. (1979)

VII Congreso Nacional de la Sociedad Española de Bioquímica

AMYES, S.G.B. & SMITH, J.T. (1974)

Antimicrobiological Agents and Chemoterapy 5: 169-178

ARNSTEIN, H.R.V. & WHITE, A.M. (1959)

Biochim. Biophys. Acta 36: 286-291

ARNSTEIN, H.R.V. & WHITE, A.M. (1961a)

Biochem. J. 79: 3P

ARNSTEIN, H.R.V. & WHITE, A.M. (1961b)

2º Eur. Symposium on Vitamin B₁₂ and Intrinsic Factor, Hamburg.

ANRSTEIN, H.R.V. & WHITE, A.M. (1962)

Biochem. J. 83: 264-270

ASWORTH, J.M. & KORNBERG, H.J. (1963)

Biochim. Biophys. Acta 73: 519-522

ASWORTH, J.M. & KORNBERG, H.L. (1964)

Biochim. Biophys. Acta 89: 383-384

ASWORTH, J.M. & KORNBERG, H.L. (1966)

Proc. Roy. Soc. Ser. B. Biol. Sci. 165: 179-188

- ASWORTH, J.M.; KORNBERG, H.L. & WARD, R.L. (1965)
Biochem. J. 94: 28P
- AYERS, W.A. (1962a)
Arch. Biochem. Biophys. 96: 210-212
- AYERS, W.A. (1962b)
Can. J. Microbiol. 8: 861-865
- BACHMANN, B.J. & LOW, K.B. (1980)
Microbiol. Reviews 44: 1-56
- BALDWIN, R.L. (1966)
en "Physiology of digestion in the ruminants" (Doughherdy, R.W.; Allen, R.S.; Burroughs, W.; Yacobson, W.L. y McGilliard, A.E., eds.) pp. 379-389. Butterworth's Inc. Washington, DC.
- BALDWIN, R.L. & WOOD, W.A. (1964)
en "Methods in Enzimology" (Colowick, S.P. & Kaplan, N.O., eds.)
vol. 9, pp. 683-684. Academic Press. New York.
- BALDWIN, R.L.; WOOD, W.A. & EMERY, R.S. (1961)
J. Bacteriol. 83: 907-913
- BALDWIN, R.L.; WOOD, W.A. & EMERY, R.S. (1965)
Biochim. Biophys. Acta 97: 202-213
- BECK, W.S.; FLAVIN, M. & OCHOA, S. (1957)
J. Biol. Chem. 229: 997-1010
- BEINERT, H. (1962)
en "Methods in Enzimology" (Colowick, S.P. & Kaplan, N.O., eds.)
vol. 5, pp. 546-557. Academic Press. New York.

- BELLAMY, W.D. & GUNSALUS, I.C. (1944)
J. Bacteriol. 48: 191-196
- BERGEY'S Manual of sistematic bacteriology (1984)
(Krieg, N.R. & Holt, J.G., eds.) vol. 1 Williams & Wilkins. Baltimore & London.
- BERGMEYER, H.U. (1974)
en "Methods of Enzimatic Analysis" 2nd edn. (Bergmeyer, H.U., ed.) vol 1. pp . 174-175 . Academic Press. New York.
- BERGMEYER, H.U. & BERNT, E. (1974)
en "Methods of Enzimatic Analysis" 2nd edn. (Bergmeyer, H.U., ed.) vol. 2 pp. 574-579. Academic Press. New York.
- BONNER, D.M.; TATUM, E.L. & BEADLE, G.W. (1943)
Arch. Biochem. 3: 71-91
- BROWN, T.D.K. (1972)
Tesis Doctoral, University of Leicester, England.
- CALLELY, A.G. & LLOYD, D. (1964)
Biochem. J. 92: 338-345.
- CANOVAS, J.L. & KORNBERG, H.L. (1965)
Biochim. Biophys. Acta 96: 169-172.
- CANOVAS, J.L. & KORNBERG, H.L. (1968)
en "Methods in Enzimology" (Colowick, S.P. & Kaplan, N.O., eds.) vol. 13, pp. 289-291. Academic Press. New York.
- CANOVAS, J.L.; ORNSTON, L.N. & STANIER, R.Y. (1967)
Sciencie 156: 1695-1699.

- CARDON, B.P. & BARKER, H.A. (1947)
Arch. Biochem. Biophys. 12: 165-180.
- CLAYTON, R.K.; DETTMER, F.H. & ROBERTSON, A.E. (1957)
Arch. Microbiol. 26: 20-22.
- COOPER, R.A. (1969)
FEBS Symposium 19: 99-106.
- COOPER, R.A. & KORNBERG, H.L. (1965)
Biochim. Biophys. Acta 104: 618-620.
- COOPER, R.A. & KORNBERG, H.L. (1967)
Proc. R. Soc. 168: 263-280.
- COOPER, R.A. & KORNBERG, H.L. (1968)
en "Methods in Enzimology" (Colowick, S.P. & Kaplan, N.O., eds.)
vol. 13, pp. 309-314. Academic Press. New York.
- COX, G.B. & GIBSON, F. (1966)
Biochem. J. 100: 1-6.
- CHAPMAN, P.J. & DUGGLEBY, R.G. (1967)
Biochem. J. 103: 7C-9C.
- DAGLEY, S.; CHAPMAN, P.J. & GIBSON, D.T. (1965)
Biochem. J. 97: 643-650.
- DAGLEY, S. & PATEL, M.D. (1957)
Biochem. J. 66: 227-233.
- DAVIS, B.D. (1950)
Experientia 6: 41-50.

- DAVIS, B.D. (1951)
J. Biol. Chem. 191: 315-325
- DAVIS, B.D. (1952a)
J. Bacteriol. 64: 729-748
- DAVIS, B.D. (1952b)
J. Bacteriol. 64: 749-763
- DAVIS, B.D. & MINGIOLI, E.S. (1953)
J. Bacteriol. 66: 129-136
- DE HERTOOGH, A.A.; MAYEUX, P.A. & EVANS, H.J. (1964a)
J. Bacteriol. 87: 746-751
- DE HERTOOGH, A.A.; MAYEUX, P.A. & EVANS, H.J. (1964b)
J. Biol. Chem. 239: 2446-2453
- DeLEY, J. & STOUTHAMER, A.J. (1959)
Biochim. Biophys. Acta 34: 171-183
- DEMEREK, M.; ADELBERG, E.A.; CLARK, A.J. & HARTMAN, P.E.
(1966)
Genetics 54: 61-76
- DEN, H.; ROBINSON, W.G. & COON, M.J. (1959)
J. Biol. Chem. 234: 1666-1671
- DIXON, G.H. & KORNBERG, H.L. (1959)
Biochem. J. 72: 3P
- DONNELLY, M.I. & COOPER, R.A. (1981a)
J. Bacteriol. 145: 1425-1427

- DONNELLY, M.I. & COOPER, R.A. (1981b)
Eur. J. Biochem. 113: 555-561
- DOVER, S. & HALPERN, Y.S. (1972)
J. Bacteriol. 109: 835-843
- DOVER, S. & HALPERN, Y.S. (1974)
J. Bacteriol. 117: 494-501
- ELSDEN, S.R. & ORMEROD, J.G. (1956)
Biochem. J. 63: 691-697
- FLAVIN, M.; CASTRO-MENDOZA, H. & BECK, W.S. (1956)
Fed. Proc. 15: 252-253
- FLAVIN, M.; CASTRO-MENDOZA, H. & OCHOA, S. (1956)
Biochim. Biophys. Acta 20: 591-599
- FLAVIN, M.; CASTRO-MENDOZA, H. & OCHOA, S. (1957)
J. Biol. Chem. 229: 981-996
- FLAVIN, M. & OCHOA, S. (1957)
J. Biol. Chem. 229: 965-979
- FLAVIN, M.; ORTIZ, P.G. & OCHOA, S. (1955)
Nature 176: 823-826
- FOUBERT, E.L. & DOUGLAS, H.C. (1948)
J. Bacteriol. 56: 25-34
- FRERMAN, F.E.; KIM, J.P.; HUHTA, K. & MCKEAN, M.C. (1980)
J. Biol. Chem. 255: 2195-2198

- FRIEDBERG, F.; ADLER, J. & LARDY, H.A. (1956)
J. Biol. Chem. 219: 943-948.
- FRIEDEMANN, T.E. & HAUGEN, G.E. (1943)
J. Biol. Chem. 147: 415-419
- GARRIDO-PERTIERRA, A. & COOPER, R.A. (1976)
J. Bacteriol. 129: 1208-1214
- GIBSON, M.I. & GIBSON, F. (1964)
Biochem. J. 90: 248-256
- GIBSON, J. & KNIGHT, M. (1961)
Biochem. J. 78: 8P
- GIOVANELLI, J. & STUMPF, P.K. (1957)
J. Am. Chem. Soc. 79: 2652-2653
- GIOVANELLI, J. & STUMPF, P.K. (1958)
J. Biol. Chem. 231: 411-426
- GOLDFINE, H. & STADTMAN, E.R. (1960)
J. Biol. Chem. 235: 2238-2245
- GORINI, L. & KAUFMAN, H. (1960)
Science 131: 604-605
- GRAVEL, R.A.; LAM, K.F.; MUHURAN, D. & KRONIS, A. (1980)
Arch. Biochem. Biophys. 201: 669-673
- GUIRARD, B.M.; SNELL, E.E. & WILLIAMS, R.J. (1946a)
Arch. Biochem. 9: 361-379

- GUIRARD, B.M.; SNELL, E.E. & WILLIAMS, R.J. (1946b)
Arch. Biochem. 9: 381-386
- GUNSALUS, I.C.; BELLAMY, W.D. & UMBREIT, W.W. (1944)
J. Biol. Chem. 155: 685-686
- GUNSALUS, I.C.; DULIN, M.I. & STRUGLIA, L. (1952a)
J. Biol. Chem. 194: 849-857
- GUNSALUS, I.C.; STRUGLIA, L. & O'KANE, D.J. (1952b)
J. Biol. Chem. 194: 859-869
- GURNANI, S.; MISTRY, S.P. & JOHNSON, B.C. (1960)
Biochim. Biophys. Acta 38: 187-195
- GUTNICK, D.; CALVO, J.M.; KLOPOTOWSKI, T. & AMES, B.N.
(1969)
J. Bacteriol. 100: 215-219
- HAASE, C.; HENRIKSON, K.P.; TREBLE, D.H. & ALLEN, S.H.G.
(1982)
J. Biol. Chem. 257: 11994-11999
- HALENZ, D.R. & LANE, M.D. (1960)
J. Biol. Chem. 235: 878-883
- HALL, C.L.; LAMBETH, J.D. & KAMIN, H. (1979)
J. Biol. Chem. 254: 2023-2031
- HENRIKSON, K.P. & ALLEN, S.H.G. (1979)
J. Biol. Chem. 254: 5888-5891

HEPPEL, L.A. (1971)

"The concept of Periplasmic enzymes, in Structure and Function of Biological Membranes", (Rothfield, L.I., ed.) pp. 224-284. Academic Press. London.

HITCHINGS, G.H. (1969)

Postgrad. Med. J. 45: 7-10

HODGSON, B. & McGARRY, J.D. (1968a)

Biochem. J. 107: 7-19

HODGSON, B. & McGARRY, J.D. (1968b)

Biochem. J. 107: 19-28

HORNBERGER, C.S., Jr.; HEITMILLER, R.F.; GUNSALUS, I.C.; SCHNAKENBERG, G.H.F. & REED, L.J. (1953)

J. Am. Chem. Soc. 75: 1273-1277

HSIE, A.W. & RICKENBERG, H.V. (1966)

Biochem. Biophys. Res. Commun. 25: 676-683

ICHIHARA, A.; ADACHI, K.; HOSOKAWA, K. & TAKEDA, Y. (1962)

J. Biol. Chem. 237: 2296-2302

INGEBRETSEN, O.C. & FARSTAD, M. (1980)

J. Chromatography 202: 439-445

KALOUSEK, F.; DARIGO, M.D. & ROSENBERG, L.E. (1980)

J. Biol. Chem. 255: 60-65

KARLSSON, J.L. & BARKER, H.A. (1948)

J. Biol. Chem. 175: 913-921

- KATZ, J. & CHAIKOFF, J.L. (1955)
J. Am. Chem. Soc. 77: 2659-2663
- KAY, W.W. (1972)
Biochim. Biophys. Acta 264: 508-521
- KAY, W.W. (1978)
en "Bacterial Transport" (Rosen, B.P., ed.) pp. 385-410. Marcel
Dekker, INC. New York.
- KAZIRO, Y. & OCHOA, S. (1964)
Advan. Enzymol. 26: 283-378
- KAZIRO, Y.; OCHOA, S.; WARNER, R.C. & CHEN, J.Y. (1961)
J. Biol. Chem. 236: 1917-1923
- KELLERMEYER, R.W. & WOOD, H.G. (1968)
en "Methods in Enzymology" (Colowick, S.P. & Kaplan, N.O., eds.)
vol. 13, pp. 207-213. Academic Press. New York.
- KIDDER, G.W. & DeWEY, V.C. (1949)
Arch. Biochem. 20: 433-443
- KILBY, B.A. (1951)
Biochem. J. 49: 671-674
- KLUYVER, A.J. & van ZIJP, J.C.M. (1951)
Antonie van Leeuwenhoek 17: 315-324
- KNIGHT, M. (1962)
Biochem. J. 84: 170-185

- KOŁODZIEJ, B.J.; WEGENER, W.S. & AJL, S.J. (1968)
Arch. Biochem. Biophys. 123: 66-71
- KORNBERG, H.L. (1963)
Biochim. Biophys. Acta 73: 517-519
- KORNBERG, H.L. (1965)
en "Regulations chez les microorganismes" pp. 193-208. Centre National de la Recherche Scientifique, Paris.
- KORNBERG, H.L. (1966a)
en "Essay in Biochemistry" (Campbell, P.N. & Greville, G.D., eds.) vol. 2, pp. 1-31. Academic Press. London & New York.
- KORNBERG, H.L.; GOTTO, A.M. & LUND, P. (1958)
Nature 182: 4430-4431
- KORNBERG, H.L. & MADSEN, N.B. (1958)
Biochem. J. 68: 549-557
- KREBS, H.A. (1964)
Proceedings of the Robert A. Welch Foundation Conferences on Chemical Research 8: 101-129
- KREBS, H.A. & KORNBERG, H.L. (1957)
Nature 179: 988-1004
- LADD, J.N. (1959)
Biochem. J. 71: 16-22
- LADD, J.N. & WALKER, D.J. (1959)
Biochem. J. 71: 364-373

- LARDY, H.A. & ADLER, J. (1956)
J. Biol. Chem. 219: 933-940
- LARDY, H.A. & PEANASKY, R.J. (1953)
Physiol. Rev. 33: 560-569
- LARSEN, H. (1951)
J. Biol. Chem. 193: 167-175
- LAYNE, E. (1957)
en "Methods in Enzymology" (Colowick, S.P. & Kaplan, N.O., eds.)
vol. 3, pp. 447-454. Academic Press. New York.
- LEAVER, F.W.; WOOD, H.G. & STJERNHOLM, R. (1955)
J. Bacteriol. 70: 521-530
- LEDERBERG, J. & ZINDER, N.J. (1948)
J. Am. Chem. Soc. 70: 4267-4268
- LEISTNER, E.; SCHMITT, J.H. & ZENK, M.H. (1967)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 28: 845-850
- LENGYEL, P.; MAZUMDER, R. & OCHOA, S. (1960)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 46: 1312-1314
- LEVIN, J.G. & SPRINSON, D.B. (1960)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 3: 157-163
- LEVIN, J.G. & SPRINSON, D.B. (1964)
J. Biol. Chem. 239: 1142-1150

LONG, P.M. (1973)

Tesis Doctoral. University of Leicester. England.

LOW, B. & FALKINHAM, S.O. (1972)

en "Handbook of Microbiology" (Laskin, A.I. & Lechevalier, L., eds.) vol. 4, pp. 54-82. Chemical Rubber Co., Cleveland. Ohio.

LLOYD, D. (1966)

Nature, 211: 765

LLOYD, D. & CALLELY, A.G. (1965)

Biochem. J. 97: 176-179

MAEBA, P. & SANWAL, B.D. (1968)

en "Methods in Enzymology" (Colowick, S.P. & Kaplan, N.O., eds.) vol. 13, pp. 283-288. Academic Press. New York.

MAEBA, P. & SANWAL, B.D. (1969)

J. Biol. Chem. 224: 2549-2557

MAHLER, H.R. (1962)

en "Methods in Enzymology" (Colowick, S.P. & Kaplan, N.O., eds.) vol. 8, pp. 553-559. Academic Press. New York.

MAHLER, H.R. & HUENNEKENS, F.M. (1953)

Biochim. Biophys. Acta 11: 575-583

MALCOVATI, M.G.; VALENTINI, G. & KORNBERG, H.L. (1973)

Acta Vitaminol Enzymol. 27: 96-111

MARCHESI, S.L. & LATJA, L.G. (1961)

2^o Eur. Symposium on Vit. B₁₂ and Intrinsic Factor, Hamburg.

- MAZUMDER, R.; SASAKAWA, T. & OCHOA, S. (1963)
J. Biol. Chem. 238: 50-53
- MEGRAW, R.E.; REEVES, H.C. & AJL, S.J. (1965a)
J. Bacteriol. 90: 984-988
- MEGRAW, R.E.; REEVES, H.C. & AJL, S.J. (1965b)
Bacteriol. Proc. p74: 85
- MELLA, S. y GARRIDO-PERTIERRA, A. (1980)
An. Fac. Vet. León 26: 17-26
- MILLER, J.H. (1972)
"Experiments in Molecular Genetics". Cold Spring Harbor. New York.
- MIOVIC, M. & PIZER, L.I. (1971)
J. Bacteriol. 106: 856-862
- MITSUSHASHI, S. & DAVIS, B.D. (1954)
Biochim. Biophys. Acta 15: 268-280
- O'KANE, D.J. & GUNSALUS, I.C. (1948)
J. Bacteriol. 56: 499-505
- OLSEN, I. & MERRIK, J.M. (1968)
J. Bacteriol. 95: 1774-1778
- OLSON, J.A. (1954)
Nature 174: 695-697
- ORNSTON, L.N. (1966)
J. Biol. Chem. 241: 3800-3810

- ORNSTON, L.N. & ORNSTON, M.K. (1969)
J. Bacteriol. 98: 1098-1108
- ORNSTON, L.N. & STANIER, R.Y. (1966)
J. Biol. Chem. 241: 3776-3786
- OVERATH, P.; PAULI, G. & SCHAIRER, H.U. (1969)
Eur. J. Biochem. 7: 559-574
- PALLERONI, N.J. & STANIER, R.Y. (1964)
J. Gen. Microbiol. 35: 319-334
- PHARES, E.F.; DELWICHE, E.A. & CARSON, S.F. (1956)
J. Bacteriol. 71: 609-615
- POE, M.; BREEZE, A.S.; WU, J.K.; SHORT, C.R., Jr. &
HOOGSTEEN, K. (1979)
J. Biol. Chem. 254: 1799-1805
- QUASTEL, J.H. (1957)
en "Methods in Enzymology" (Colowick, S.P. & Kaplan, N.O., eds.)
vol. 4, pp. 329-337. Academic Press. New York.
- QUAYLE, J.R. (1963a)
Biochem. J. 87: 368-373
- QUAYLE, J.R. (1963b)
Biochem. J. 89: 492-503
- QUAYLE, J.R. (1968)
en "Methods in Enzymology" (Colowick, S.P. & Kaplan, N.O., eds.)
vol. 13, pp. 293-296. Academic Press. New York.

RABIN, R.; REEVES, H.C.; WEGENER, W.S.; MEGRAW, R.E. & AJL, S.J. (1965)

Science 150: 1548-1558

REED, L.J.; GUNSALUS, I.C.; SCHNAKENBERG, C.H.F.; SOPER, Q.F.; BOAZ, H.E.; KERN, S.F. & PARKE, T.V. (1953)

J. Am. Chem. Soc. 75: 1267-1270

REEVES, H.C. & AJL, S.J. (1960)

J. Bacteriol. 79: 341-345

REEVES, H.C. & AJL, S.J. (1962)

J. Bacteriol. 84: 186-187

REEVES, H.C. & AJL, S.J. (1963)

Biochem. Biophys. Res. Commun. 12: 132-136

REEVES, H.C. & AJL, S.J. (1965a)

Biochim. Biophys. Acta 97: 600-602

REEVES, H.C. & AJL, S.J. (1965b)

J. Biol. Chem. 240: 569-573

REEVES, R.E. & SOLS, A. (1973)

Biochem. Biophys. Res. Commun. 50: 459-466

REEVES, H.C.; STAHL, W.J. & AJL, S.J. (1963)

J. Bacteriol. 86: 1352-1353

REEVES, H.C.; URBANO, C. & AJL, S.J. (1965)

Bacteriol. Proc. p73: 85

RENDINA, G. & COON, M.J. (1957)

J. Biol. Chem. 225: 523-534

RICHARDS, S.A. & LLOYD, D. (1966)

Biochem. J. 99: 56P

ROBERTS, R.B.; ABELSON, P.H.; COWIE, D.B.; BOLTON, E.T.
& BRITTEN, R.J. (1955)

"Studies of Biosynthesis in Escherichia coli". Carnegie Institution of Washington. Publication No. 607.

ROSENBERG, R.F. (1962)

Biochim. Biophys. Acta 64: 168-170

SALAMON, I.I. & DAVIS, B.D. (1953)

J. Am. Chem. Soc. 75: 5567-5571

SALANITRO, J.P. & WEGENER, W.S. (1971)

J. Bacteriol. 108: 885-892

SANDERSON, K.E. & HARTMAN, P.E. (1978)

Bacteriol. Reviews 42: 471-519

SATYANARAYANA, T. & RADHAKRISHNAN, A.N. (1962)

Biochim. Biophys. Acta 56: 197-199

SAZ, H.J. (1954)

Biochem. J. 58: 20-21

SAZ, H.J. & HILLARY, E.P. (1956)

Biochem. J. 62: 563-569

- SCHIMD, J.; REINSCH, J. & McFARLAND, J.T. (1981)
J. Biol. Chem. 256: 11667-11670
- SHAW, L. & ENGEL, P.C. (1984)
Biochem. J. 218: 511-520
- SIMON, E.J. & SHEMIN, D. (1953)
J. Am. Chem. Soc. 75: 2520
- SMITH, R.A. & GUNSALUS, I.C. (1954)
J. Am. Chem. Soc. 76: 5002-5003
- SMITH, R.A. & GUNSALUS, I.C. (1957)
J. Biol. Chem. 229: 305-319
- SMITH, J. & KORNBERG, H.L. (1967)
J. Gen. Microbiol. 47: 175-180
- SMITH, R.M. & MONTY, K.J. (1959)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 1: 105-114
- SOKATCH, J.R. (1966)
J. Bacteriol. 92: 72-75
- SOKATCH, J.R. (1967)
Bacteriol. Proc. p187: 133
- SPRATT, S.K.; GINSBURGH, C.L. & NUNN, W.D. (1981)
J. Bacteriol. 143: 1166-1169

STADTMAN, E.R. (1955a)

en "Methods in Enzymology" (Colowick, S.P. & Kaplan, N.O., eds.)
vol. 1, pp. 596-599. Academic Press. New York.

STADTMAN, E.R. (1955b)

J. Am. Chem. Soc. 77: 5765-5766

STADTMAN, E.R. (1956)

Fed. Proc. 15: 360-361

STADTMAN, E.R. (1957a)

en "Methods in Enzymology" (Colowick, S.P. & Kaplan, N.O., eds.)
vol. 3, pp. 228-232. Academic Press. New York.

STADTMAN, E.R. (1957b)

en "Methods in Enzymology" (Colowick, S.P. & Kaplan, N.O., eds.)
vol. 3, pp. 931-941. Academic Press. New York.

STADTMAN, E.R. & BARKER, H.A. (1950)

J. Biol. Chem. 184: 769-793

STADTMAN, E.R.; OVERATH, P.; EGGERER, H. & LYNEN, F.
(1960)

Biochem. Biophys. Res. Commun. 2: 1-7

STADTMAN, E.R. & VAGELOS, P.R. (1958)

en "International Symposium on Enzyme Chemistry", Tokyo & Kyoto;
pp. 86-93. Pan Pacific Press. Tokyo.

STANIER, R.Y. (1947)

J. Bacteriol. 54: 339-348

- STJERNHOLM, R.; NOBLE, R.E. & KOCHWESER, D. (1962)
Biochim. Biophys. Acta 64: 174-177
- STJERNHOLM, R.; NOBLE, R.E. & KOCHWESER, D. (1967)
Biochem. J. 102: 885-891
- STJERNHOLM, R. & WOOD, H.G. (1961)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 47: 303-304
- STOKSTAD, E.L.R.; HOFFMANN, C.; REGAN, M.A.; FURDHAM, D.
& TUKES, T.H. (1949)
Arch. Biochem. 20: 75-82
- STONE, R.W. & WILSON, P.W. (1952)
J. Bacteriol. 63: 605-617
- STOOLMILLER, A.C. & ABELESS, R.H. (1966)
J. Biol. Chem. 241: 5764-5771
- SWIN, H.E. & KRAMPITZ, L.O. (1954)
J. Bacteriol. 67: 419-425
- THEODORE, T.S. & ENGLESBERG, E. (1964)
J. Bacteriol. 88: 946-955
- THIJSSE, G.J.E. (1964)
Biochim. Biophys. Acta 84: 195-197
- TIEZ, A. & OCHOA, S. (1959)
J. Biol. Chem. 234: 1394-1400

- UMBARGER, H.E.; BROWN, B. & EYRING, E. J. (1960)
J. Biol. Chem. 235: 1425-1432
- UMBREIT, W.W. & GUNSALUS, I.C. (1949)
J. Biol. Chem. 179: 279-281
- UTTER, M.F. (1963)
Iowa State J. Sci. 38: 97-103
- VAGELOS, P.R. (1960)
J. Biol. Chem. 235: 346-350
- VAGELOS, P.R. & EARL, J.M. (1959)
J. Biol. Chem. 234: 2272-2280
- VAGELOS, P.R.; EARL, J.M. & STADTMAN, E.R. (1959a)
J. Biol. Chem. 234: 490-497
- VAGELOS, P.R.; EARL, J.M. & STADTMAN, E.R. (1959b)
J. Biol. Chem. 234: 765-769
- VANDERWINKEL, E. & DE VLIEGHERE, M. (1968)
Eur. J. Biochem. 5: 81-90
- WAGNER, C.; ODOM, R. & BRIGGS, W.T. (1972)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 47: 1036-1043
- WEEKS, G.; SAPHIRO, M.; BURNS, R.O. & WAKIL, S.J. (1969)
J. Bacteriol. 97: 827-836
- WEGENER, W.S.; FURMANSKI, P. & AJL, S.J. (1967)
Biochim. Biophys. Acta 144: 34-50

- WEGENER, W.S.; REEVES, H.C. & AJL, S.J. (1967a)
Arch. Biochem. Biophys. 121: 440-442
- WEGENER, W.S.; REEVES, H.C. & AJL, S.J. (1967b)
Bacteriol. Proc. p188: 133
- WEGENER, W.S.; REEVES, H.C. & AJL, S.J. (1968a)
Arch. Biochem. Biophys. 123: 55-61
- WEGENER, W.S.; REEVES, H.C. & AJL, S.J. (1968b)
Arch. Biochem. Biophys. 123: 62-65
- WEGENER, W.S.; REEVES, H.C.; RABIN, R. & AJL, S.J.
(1968a)
en "Methods in Enzymology" (Colowick, S.P. & Kaplan, N.O., eds.)
vol. 13, pp. 362-365. Academic Press. New York.
- WEGENER, W.S.; REEVES, H.C.; RABIN, R. & AJL, S.J.
(1968b)
Bacteriol. Reviews 32: 1-26
- WEGENER, W.S.; VANDERWINKEL, E.; REEVES, H.C. & AJL, S.J.
(1969)
Arch. Biochem. Biophys. 129: 545-553
- WEISS, U.; DAVIS, B.D. & MINGIOLI, E.S. (1953)
J. Am. Chem. Soc. 75: 5572-5576
- WHEELIS, M.L.; PALLERONI, N.J. & STANIER, R.Y. (1967)
Arch. Microbiol. 59: 302-314

- WIELAND, T. & KÖPPE, H. (1953)
Ann. 581: 1-7
- WIELAND, T. & KÖPPE, H. (1954)
Ann. 588: 15-19
- WILLIAMSON, G. & ENGEL, P.C. (1984)
Biochem. J. 218: 521-529
- WONG, D.T.O. & AJL, S.J. (1955)
Nature 176: 970-971
- WONG, D.T.O. & AJL, S.J. (1956)
J. Am. Chem. Soc. 78: 3230-3236
- WONG, D.T.O. & AJL, S.J. (1957)
Science 126: 1013-1014
- WOOD, H.G.; JACOBSON, B.; GERWIN, B.I. & NORTHROP, B.B.
(1968)
en "Methods in Enzymology" (Colowick, S.P. & Kaplan, N.O., eds.)
vol. 13, pp. 216-217. Academic Press. New York.
- WOOD, H.G. & STJERNHOLM, R. (1961)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 47: 289
- WOOD, H.G. & UTTER, M.F. (1966)
en "Essays in Biochemistry" (Campbell, P.N. & Greville, E.D.,
eds.) vol. 1, pp. 1-27. Academic Press. London.
- ZABOURA, M. & HALPERN, Y.S. (1978)
J. Bacteriol. 133: 447-451